

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
3. Januar 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/000888 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/10**,  
15/34, 15/62, C07K 14/01

Lappersdorf (DE). **MILLER, Stefan** [DE/DE]; Holz-  
gartenstrasse 51, 93053 Regensburg (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02302

(74) **Anwälte: BETTENHAUSEN, Berthold** usw.; Dehmel &  
Bettenhausen, Müllerstr. 1, 80469 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
24. Juni 2002 (24.06.2002)

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 29 815.3 24. Juni 2001 (24.06.2001) DE

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): PROFOS AG** [DE/DE]; Josef-Engert-Strasse 9,  
93053 Regensburg (DE).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): KARETH, Michael**,  
Schütz [DE/DE]; Jakob-Schmid-Strasse 13, 93138  
Lappersdorf (DE). **GRASSL, Renate** [DE/DE];  
Gumpelzhaimerstrasse 1, 93049 Regensburg (DE).  
**MEYER, Roman** [DE/DE]; Rosenstrasse 6, 92287  
Schmidmühlen (DE). **FRICK, Sibylle** [DE/DE]; Haupt-  
strasse 9, 93197 Zeitlarn (DE). **ROBL, Ingrid** [DE/DE];  
Käthe-Kollwitz-Strasse 32, 93055 Regensburg (DE).  
**ZANDER, Thomas** [DE/DE]; Goethestrasse 14a, 93138

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/000888 A2

(54) **Title:** METHOD FOR SEPARATING BACTERIAL CELLS AND CELL COMPONENTS

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR AUFRÄUIGUNG VON BAKTERIENZELLEN UND ZELLBESTANDTEILEN

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for selectively separating bacterial cells and/or cell components, whereby the separation is carried out using a solid support.

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Aufreinigung von Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen, wobei die Aufreinigung mittels eines festen Trägers durchgeführt wird.

## 5      **Verfahren zur Aufreinigung von Bakterienzellen und Zellbestandteilen**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Aufreinigung von Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen, wobei die Aufreinigung mittels eines festen Trägers  
10 durchgeführt wird.

Ausgangspunkt fast jeder Weiterverarbeitung, Analyse oder Isolierung von Zellbestandteilen ist die Anreicherung der Zellen, die „Zellernte“. Diese wird üblicherweise mittels Zentrifugation durchgeführt. Dieser Zentrifugationsschritt stellt das Hauptproblem bei der vollständigen  
15 Automatisierung von Verfahren, wie der Plasmidaufreinigung dar, da neben dem hohen technischen Aufwand zur Integration einer Zentrifuge in einen entsprechenden Verarbeitungsroboter eine extrem hohe Präzision bei Start- und Stop-Position des Zentrifugationsvorganges benötigt wird. Automatische Verfahren der Weiterverarbeitung, Analyse oder Isolierung von Zellbestandteilen beginnen daher in der Regel mit bereits  
20 ausserhalb des Verarbeitungsroboters angereicherten, abzentrifugierten oder sedimentierten Zellen. So ist zum Beispiel für eine schnelle Analyse von vollständigen Genomen, Proteomen, aber auch der raschen Struktur- und Funktionsaufklärung in Hochdurchsatzverfahren eine möglichst vollständige Automatisierung der dabei relevanten Verfahren essentiell. Dabei ist die Automatisierung z.B. in der Genomanalyse bereits weit fortgeschritten: Sowohl die  
25 Bakterienanzucht, als auch die Plasmidisolierung können automatisch durchgeführt werden. Eine vollständige Automatisierung des Verfahrens einschließlich der Zellernte ist bisher jedoch nicht durchführbar. Insbesondere eine selektive Zellernte, also die spezifische Anreicherung bestimmter Zellen aus einer Zellmischung ist mit den derzeit üblichen Ernteverfahren nicht möglich.

30 Üblicherweise wird die Zellernte mit den folgenden Verfahren durchgeführt: Das Standardverfahren der Zellernte ist die unspezifische Abzentrifugation der Bakterienkulturen. Dazu ist gerade bei Verfahren, die für höheren Durchsatz ausgelegt werden sollen, eine Mikrotiterplattenzentrifuge nötig. Jedoch ist die Zentrifugation als solches nicht zur  
35 Automatisierung geeignet.

Die Filtration der kultivierten Zellen über entsprechende Filtermembranen ist zwar als solches

möglich, jedoch ermöglicht auch diese nur eine unspezifische Anreicherung der Zellen. Darüber hinaus ist das Verfahren bei hochangereicherten Zellsuspensionen und der damit einhergehenden hohen Viskosität der Lösungen sehr störanfällig bezüglich Verstopfungen.

- 5 Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung ist ein Verfahren, bei dem ein sehr dünner Flüssigkeitsfaden eingesetzt wird, der über Laser eine Sortierung und Anreicherung einzelner fluoreszenzmarkierter Zellen ermöglicht. Durch den Einsatz entsprechender Fluoreszenzlabel ist zwar eine gewisse Spezifität der Anreicherung möglich, durch den dünnen Flüssigkeitsfaden ist das Verfahren auf geringe Volumina und damit geringen Durchsatz limitiert. Somit könnten nur
- 10 geringe Zellmengen angereichert werden, was für die Weiterverarbeitung oder Analyse von Zellbestandteilen nicht ausreichend ist. Die hohen Kosten für die apparative Ausstattung verhindert zudem die starke Verbreitung der Technik und bremst die Parallelisierung, die für eine Hochdurchsatzzellernte nötig ist.
- 15 Bei der magnetischen Zellseparation werden die Zellen direkt über ionische Wechselwirkungen an Magnetpartikel gebunden und durch Anlegen eines Magnetfeldes lokal aufkonzentriert. Derartige Verfahren zur unspezifischen Konzentrierung von Bakterien werden von Chemagen (EP 1 118 676), Genpoint (WO 01/53525, WO 98/51693), Merck (WO 00/29562), sowie Promega (US 6,284,470) oder Amersham (WO 91/12079) seit kurzem zur vollständigen
- 20 Automatisierung der Aufarbeitung von Plasmid- oder genomischer DNA inklusive der Zellernte vertrieben. Diese Magnetpartikel haben jedoch den Nachteil, dass sie die Bakterien einerseits unspezifisch und andererseits jedoch nicht jede Bakterienspecies gleich gut binden. Aufgrund der Unspezifität der Bindung sind sogar unterschiedliche Bindeeffizienzen bei verschiedenen Stämmen einer Spezies zu beobachten (Merck, WO 00/29562).
- 25 Daher liegt der Erfindung die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Bakterienzellen und Zellbestandteile selektiv und vollautomatisch angereichert werden können, und das in ein automatisiertes Analyse- oder Isolierungsverfahren eingebaut werden kann sowie in der Bereitstellung von festen Trägern zur selektiven Anreicherung von Bakterienzellen oder
- 30 Zellbestandteilen.

Die Aufgabe wird durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.

Die nachfolgenden Figuren erläutern die Erfindung.

Figur 1 zeigt in einer Graphik die Zeitabhängigkeit der p12-abhängigen Bindung von *E.coli* an magnetische Beads. Die Werte geben die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität immobilisierter Zellen in relativen Einheiten an. VIK (Rautensymbole) bedeutet: 2-Schritt-Verfahren (Vorinkubation von Zellen und p12, anschliessende Bindung an magnetische Beads). VC (Quadrate) bedeutet: 1-Schritt-Verfahren (Vorcoating von p12 an magnetische Beads, anschliessende Immobilisierung von Zellen). -p12 (Dreiecke) bedeutet: Hintergrund (unspezifische Zellbindung an Beads ohne p12).

Figur 2 zeigt in einer Graphik die Bindung von *E.coli* an magnetische Beads über den Bakteriophagen T4. Die Werte geben die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität immobilisierter Zellen in relativen Einheiten an. VIK bedeutet: 2-Schritt-Verfahren (Vorinkubation von Zellen und T4, anschliessende Bindung an magnetische Beads). VC bedeutet: 1-Schritt-Verfahren (Vorcoating von T4 an magnetische Beads, anschliessende Immobilisierung von Zellen). K bedeutet: Hintergrund (unspezifische Zellbindung an Beads ohne T4).

Figur 3 zeigt in einem graphischen Vergleich die Ausbeuten von *E.coli* Zellen aus verschiedenen Medien. -p12 kennzeichnet die Ergebnisse ohne N-Strep-p12. +p12 kennzeichnet die Ergebnisse mit N-Strep-p12. Schraffierte Balken zeigen die Ergebnisse mit dem Stamm *E.coli* LE392, ausgefüllte Balken kennzeichnen die Ergebnisse mit dem Stamm *E.coli* JM83, LB, SOB, SOC, TB und YT 2x bezeichnen die jeweiligen Medien in denen der Versuch durchgeführt wurde. Die Werte sind angegeben als Ausbeuten in % der eingesetzten Zellen ermittelt über die Streuung des Überstandes bei 600 nm nach Pelletierung der gebundenen Zellen mittels eines Magneten.

Figur 4 zeigt graphisch das Ergebnis der Plasmidisolierung nach Ernte von *E.coli* mit p12 nach dem 2-Schritt-Verfahren. Stamm DH10b mit Plasmid pUC19. 1: Zentrifugierte Zellen, DNA-Isolierung über solid phase extraction, 2: Mit dem erfindungsgemäßen 2-Schritt-Verfahren geerntete Zellen, DNA-Isolierung über solid phase extraction, 3: Zentrifugierte Zellen, DNA-Isolierung über magnetische Beads, 4: Mit dem erfindungsgemäßen 2-Schritt-Verfahren geerntete Zellen, DNA-Isolierung magnetische Beads, 5: Standard.

Figur 5 zeigt in einer graphischen Darstellung die Anreicherung von *E.coli* Zellen aus 10ml Kulturvolumen, ausgehend von Zellsuspensionen unterschiedlicher Zelldichte ( $10^9$ - $10^7$  CFU/ml). Graph A: die ausgefüllten Balken geben die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der über N-Strep-p12 gebundenen Zellen an, die schraffierten Balken zeigen den Hintergrund ohne p12. Graph B: die

ausgefüllten Balken geben die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der über T4-bio gebundenen Zellen an, die schraffierten Balken zeigen den Hintergrund ohne T4.

Figur 6 zeigt schematisch die Lebend-Ernte von *E.coli* über biotinyliertes p12 und Streptavidin-Beads. Die ausgefüllten Balken geben die Streuung bei 600 nm nach 2h Wachstum an. Die schraffierten Balken markieren die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der Zellen. Die Abkürzungen bedeuten: P12: Bestimmungen der immobilisierten Zellen an den Beads, P12-EDTA: Bestimmungen der von den Beads nach der Bindung abgelösten Zellen (Überstand nach EDTA-Behandlung), EDTA-p12: Immobilisierung der Zellen an die Beads wurde durch die Gegenwart von EDTA verhindert; Bestimmungen der unspezifischen Zellen an den Beads, K. Kontrollversuch ohne p12; Bestimmungen an den Beads.

Figur 7 zeigt tabellarisch die selektive Bindung von p12 an Bakterienzellen. Tabelle A listet die p12-abhängige Bindung verschiedener *E.coli* Stämme auf, Tabelle B gibt die Spezifität der p12-abhängigen Bindung an. Die Abkürzung n.d. steht für nicht ermittelt, + bedeutet Bindung von p12 an die angegebenen Bakterien, - bedeutet keine Bindung von p12 an die Zellen.

Figur 8 zeigt graphisch dargestellt die Spezifität der p12-abhängigen Bindung. Die Werte geben die Ausbeute von immobilisierten Zellen, ermittelt über die Streuung im Überstand bei 600 nm, an. Die schraffierten Balken geben die Werte für die Zellbindung über N-Strep-p12 an (= spezifische Bindung). Die dunklen ausgefüllten Balken zeigen die Kontrolle ohne p12 (= unspezifische Adsorption). Die hellen ausgefüllten Balken geben die Werte für die Zellbindung mit p12, jedoch in Gegenwart von 10mM EDTA an (= unspezifische Adsorption).

Figur 9 zeigt lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der selektiven Bindung von *E.coli* an magnetische Beads über T4-bio in einer Mischkultur aus *E.coli* und *Serratia marrescens*. Die *E.coli* Zellen wurden fluoreszenzmarkiert mit FITC-markiertem T4-p12. Die linken Bilder zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen, die rechten Bilder zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Die oberen Bilder zeigen Aufnahmen eines Versuchs ohne T4-bio, die unteren Bilder zeigen Aufnahmen eines Versuchs mit T4-bio.

Figur 10 zeigt in einer graphischen Darstellung das Ergebnis der Zellernte nach dem 2-Schritt-Verfahren mit N-Strep-p12 aus Lösungen mit unterschiedlicher Zellzahl. S/N-ratio bezeichnet das Signal-Rausch-Verhältnis (Signal mit N Strep-p12 dividiert durch Signal ohne N-Strep-p12)

der  $\beta$ -Galactosidase-Reaktion der gebundenen *E.coli* Zellen, CFU/ml gibt die eingesetzten Zellen (cell forming units) pro ml an. Die Quadrate kennzeichnen die Ergebnisse der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität über Messung mit einem lumineszierenden Substrat. Die Rauten kennzeichnen die Ergebnisse der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität über Messung mit einem fluoreszierenden Substrat.

5

Figur 11 zeigt in einer graphischen Darstellung das Ergebnis der Ernte von *E.coli* Zellen nach dem 1-Schritt-Verfahren mit T4p12 kovalent gebunden an magnetische EM2-100/49 Beads (Merck Eurolab). +p12 bezeichnet die Ergebnisse mit Beads mit T4p12; -p12 bezeichnet die Ergebnisse mit Beads ohne T4p12, DSMZ 613 bezeichnet die Ergebnisse mit dem Stamm *E.coli* DSMZ 613, DSMZ 13127 bezeichnet die Ergebnisse mit dem Stamm *E.coli* DSMZ 13127.

10

Figur 12 zeigt in einer graphischen Darstellung das Ergebnis der Ernte von *E.coli* Zellen nach dem 1-Schritt-Verfahren mit T4p12 adsorbiert an magnetische PVA-Beads. Die Rauten kennzeichnen die Ergebnisse mit den Beads PVA-011 (Chemagen). Die Quadrate kennzeichnen die Ergebnisse mit den Beads PVA-012. Durchgehende Linien bezeichnen die Ergebnisse mit Beads an die T4p12 adsorbiert wurde, gestrichelte Linien Beads ohne T4p12. Die OD600 Werte geben die % geernteter Zellen in % der Streuung des Überstandes nach Pelletierung der gebundenen Zellen mittels eines Magneten an.

15

Der hier verwendete Ausdruck "Phagenproteine" oder "Bakteriophagenproteine" bezeichnet alle Proteine von Bakteriophagen, die an der Erkennung und Bindung der Bakterienzellen oder Zellbestandteilen beteiligt sind. Diese können je nach morphologischer Beschaffenheit der Phagen z.B. direkt auf der Phagenhülle oder auf speziellen Erkennungsstrukturen, den Schwanzfasern lokalisiert sein. Demzufolge bezeichnet der Ausdruck „Bakteriophagenschwanzproteine“ die Phagenproteine, die den Bakteriophagenschwanz darstellen oder Teil des Bakteriophagenschwanzes sind.

20

25

Der hier verwendete Ausdruck "Spezifität" bedeutet, dass die Bakteriophagen oder Phagenproteine sowohl nur eine einzige Gattung oder Species oder auch Sub-Species von Bakterienzellen oder Zellbestandteile erkennen und binden, als auch, dass manche Bakteriophagen oder Phagenproteine auch bestimmte Bakteriengruppen erkennen und binden.

30

Der hier verwendete Ausdruck "Aufreinigung" oder "Anreicherung" bedeutet das spezifische Abtrennen von Bakterienzellen oder Zellbestandteilen von der wässrigen Lösung, z.B. dem

Kulturmedium, in der sich die Bakterienzellen oder Zellbestandteile befinden. Das Aufreinigen oder Anreichern wird dabei mit Hilfe von festen Trägern z.B. Magnetpartikeln, Glaspartikel, Agarosepartikel, Reaktionsgefäßen oder Mikrotiterplatten durchgeführt.

- 5 Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zur selektiven Aufreinigung von Bakterienzellen oder Zellbestandteilen, umfassend die folgenden Schritte: (Zwei-Schritt-Verfahren)
- a) In Kontakt bringen von einer Bakterienzellen oder Zellbestandteile enthaltenden Probe mit Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen, vorzugsweise mit einer Inkubation von  
10 etwa drei bis fünf Minuten,
  - b) anschließende Inkubation der Probe, enthaltend die Bakterienzellen oder Zellbestandteile und die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine, mit einem festen Träger, vorzugsweise für etwa drei bis 30 min,
  - c) Trennen des festen Trägers mit den daran über die Bakteriophagen und/oder  
15 Bakteriophagenproteine gebundenen Bakterienzellen oder Zellbestandteilen von der Probe.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Bakterienzellen oder Zellbestandteile selektiv zum Beispiel aus Mischkulturen verschiedener Species oder einer Kultur einer Species angereichert werden. Anzureichernde Zellbestandteile können z.B. Endotoxine, Proteine,  
20 Nukleinsäuren oder Saccharide sein. Die Selektivität des Verfahrens wird durch die Auswahl geeigneter Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine ermöglicht. Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine eignen sich für das erfindungsgemäße Verfahren am besten für eine selektive Anreicherung der Bakterien oder der Zellbestandteile, da Phagen-Bakterien-Systeme in der Natur über lange Zeiträume evolviert sind, so dass die Phagen ihre  
25 Wirtsbakterien hochspezifisch und mit hoher Bindungsaffinität erkennen. Für das erfindungsgemäße Verfahren werden vorzugsweise Bakteriophagenproteine verwendet, die für die gewünschten nachzuweisenden Bakterien spezifisch sind. Bakteriophagen wie auch Bakteriophagenproteine haben sich unter widrigen Umweltbedingungen entwickelt, so dass sie stabil gegenüber Einflüssen wie Temperatur-, pH-Schwankungen (Burda et al., Biological  
30 Chemistry 2000, 381, 255-258) u.ä. sind und somit in den unterschiedlichsten Aufreinigungspuffern eingesetzt werden können.

Welche Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine verwendet werden, hängt davon ab, welche Bakterienarten aufgereinigt werden sollen. Für eine anschließende Plasmidaufreinigung

- werden Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine bevorzugt, die *E.coli*-Bakterien selektiv binden können, da diese Bakterien die zur Zeit gebräuchlichen für eine Plasmidherstellung sind. Bereits jetzt steht eine große Zahl bekannter Bakteriophagen für einen Großteil der bisher beschriebenen Bakterien zur Verfügung und kann für die selektive
- 5 Bakterienanreicherung nutzbar gemacht werden. Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht von Bakterien und den für sie spezifischen Bakteriophagen, ohne den Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben. Die Phagen und die entsprechenden Wirtsbakterien sind u.a. bei folgenden Stammsammlungen erhältlich: ATCC (USA), DSMZ (Deutschland), UKNCC (Großbritannien), NCCB (Niederlande) und MAFF (Japan). Darüber hinaus können
- 10 Bakteriophagen gegen entsprechende Bakterien bei Bedarf beispielsweise aus Umweltproben einfach nach Standardverfahren (Seeley, N.D. & Primrose, S.B., 1982, J. Appl. Bacteriol. 53, 1-17) isoliert werden.

Bakterien:	Phagen
Acholeplasma:	0c1r, 10tur, L2, L51, M1, MVG51, MV-L1, O1, SpV1, V1, V1, V2, V4, V5
Actinomycetes:	108/016, 119, 29, 37, 43, 51, 59.1, A1-Dat, Aeh2, Bir, M1, MSP8, ø115-A, ø150A, ø31C, P-a-1, PhiC, R1, R2, SK1, SV2, VP5
Actinoplanes/Micro-monospora:	Ap3, Ap4, Mm1, Mm3, Mm4, Mm5, phiUW 51
Aeromonas:	43, 44RR2.8t, 65, Aeh1
Aeromonas hydrophila:	PM1
Agrobacterium:	PIIBNV6, PS8, psi, PT11
Alcaligenes:	8764, A5/A6, A6
Alteromonas:	PM2
Amycolatopsis:	W11, W2, W4, W7
Bacillus:	1A, alpha, AP50, BLE, F, G, GA-1, il, IPy-1, mor1, MP13, MP15, ø105, ø29 (phi 29), øNS11, PBP1, PBS1, SP10, SP15, SP3, SP8, SPP1, SPß, SPy-2, SST, type
Bacillus subtilis	168, W23, SP50, W23, SP01
Bdellovibrio:	MAC-1, MAC-2, MAC-4, MAC-5, MAC-7
Brucella:	Tb
Caulobacter:	øCb12r, øCb2, øCb23r, øCb4, øCb5, øCb8r, øCb9, øCP18, øCP2, øCr14, øCr28
Cellulomonas:	O11, O13, O2, O3, O5, O6, O8
Chlamydia:	1
Chlamydia psittaci:	.phi.CPG1
Clostridium:	Ceß, F1, HM2, HM3, HM7
Coryneforme	7/26, A, A19, AN25S-1, Arp, AS-1, BL3, CONX, MT, N1, øA8010, S-6(L), B
Cyanobacteria:	A-4(L), AC-1, LPP-1, S-2L, S-4L, SM-1
<i>E.coli</i> (O157):	P1, T1, Tula, Tulb, Tull
<i>E.coli</i> :	1ø3, 1ø7, 1ø9, 2D/13, Ae2, alpha10, alpha3, BE/1, BF23, dA, delta1, delta6, dø3, dø4, dø5, Ec9, eta8, f1, fd, G13, G14, G4, G6, HK022, HK97, HR, lambda, M13, M13mp18, M20, MM, MS2, Mu, O1, ø80, øA, øR, øX174, PA-2, P1, P1D, P2, P22, Qß, R17, S13, St-1, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, WA/1, WF/1, WW/1, zeta3, ZG/2, ZJ/2
<i>E.coli</i> R1:	C21
<i>E.coli</i> O8:	omega 8
<i>E.coli</i> (K12):	U3



Enterobacter:	chi, FC3-9, $\mu$ 2, 01, 11F, 121, 1412, 3, 3T+, 50, 5845, 66F, 7480b, 8893, 9, 9266, a1, alpha15, b4, B6, B7, Beccles, BZ13, C-1, C16, C2, C-2, DdVI, Esc-7-11, f2, fcan, FI, Folac, fr, GA, H, H-19J, I2-2, Ialpha, ID2, If1, If2, Ike, JP34, JP501, K19, KU1, M, M11, M12, MS2, NL95, $\phi$ 92, $\phi$ l, $\phi$ ii, Omega8, pIIHalpa, PR64FS, PRD1, PST, PTB, R, R17, R23, R34, sd, SF, SMB, SMP2, SP, $\beta$ , ST, tau, tf-1, TH1, TW18, TW28, VIII, VK, W31, X, Y, ZG/1, ZIK/1, ZJ/1, ZL/3, ZS/3
Klebsiella pneumoniae :	AP3, C3:
Lactobacillus:	1b6, 223, fri, hv, hw222a, $\phi$ FSW, PL-1, y5
Lactococcus lactis:	1, 643, c2, kh, m13, P008, P127, 1358, 1483, 936, 949, BK5-T, c2, KSY1, P001, P008, P107, P335, PO34, PO87
Leuconostoc:	pro2
Listeria:	4211,
Methanothermobacter:	psi M2 ( $\Psi$ M2)
Micrococcus:	N1, N5
Mollicutes:	Br1, C3, L3
Mycobacterium:	I3, lacticola, Leo, $\phi$ 17, R1-Myb
Nocardia/Rhodococcus/Gordona:	N13, N18, N24, N26, N36, N4, N5
Nocardioides:	X1, X10, X24, X3, X5, X6, D3, D4,
Pasteurella:	22, 32, AU, C-2
Promicromonospora:	P1, P2, P3, P4
Pseudomonas aeruginosa:	Phi CT, phi CTX, PB-1
Pseudomonas:	12S, 7s, D3, F116, gh-1, gh-1, Kf1, M6, $\phi$ 1, $\phi$ KZ, $\phi$ W-14, Pf1,
Pseudonocardia:	W3
Rhizobium:	2, 16-2-12, 2, 317, 5, 7-7-7, CM1, CT4, m, NM1, NT2, $\phi$ 2037/1, $\phi$ 2042, $\phi$ gal-1-R, WT1
Saccharomonospora:	Mp1, MP2
Saccharothrix:	W1
Salmonella:	epsilon15, Felix 01, 16-19, 7-11, H-19J, Jersey, N4, SasL1, VII, ZG/3A, San21
Salmonella typhimurium:	A3, A4, P22
Spiroplasma:	4, C1/TS2
Sporichthya:	Sp1
Staphylococcus:	107, 187, 2848A, 3A, 44AHJD, 6, 77, B11-M15, Twort
Streptococcus:	182, 2BV, A25, A25-24, A25-omega8, A25-PE1, A25-VD13, CP-1, Cvir, H39
Streptomyces:	P23, P26, phi A.streptomycini III, phi8238, phiC31, S1, S2, S3, S4, S6, S7, SH10
Terrabacter:	Tb1, Tb2
Tsukamurella:	Ts1
Vibrio:	06N-22P, 06N-58P, 06N-58P, 4996, alpha3alpha, I, II, III, IV, kappa, nt-1, OXN-100P, OXN-52P, v6, Vfl2, Vfl3, VP1, VP11, VP3, VP5, X29
Xanthomonas:	Cf, Cf1t, RR66,
Yersinia:	$\beta$ /C239, phiYeO3-12, YerA41

Werden statt Bakteriophagen einzelne Phagenproteine verwendet, so bieten diese den Vorteil, dass hier die Eigenschaften eines einzelnen Proteins, statt eines Komplexes aus Proteinen und Nukleinsäuren genutzt werden können. Phagenproteine sind sehr stabil (Burda et al., Biological Chemistry 2000, 381, 255-258); die Stabilität eines Einzelproteins ist wesentlich einfacher zu steuern als die eines Proteinkomplexes. Wichtig ist auch die im Gegensatz zu kompletten Phagen leichtere Modifizierbarkeit (gentechnisch, aber auch chemisch), z.B. der Einbau von „Tags“. Darüberhinaus bietet der Einsatz von Phagenproteinen Vorteile bei bestimmten

Anschlußverfahren, wie z.B. der Isolierung von Nukleinsäuren (Plasmid-DNA, RNA, genomischer DNA), da im Gegensatz zum Einsatz kompletter Phagen keine Nukleinsäureverunreinigung möglich ist.

- 5 Bevorzugt sind Phagenschwanzproteine aus der Familie der Myoviridae, der Podoviridae und Siphoviridae, insbesondere kurze Phagenschwanzproteine, insbesondere die kurzen Phagenschwanzproteine der „geradzahligen T-Phagen“ z.B. von T4, T2 oder K3, insbesondere das Bakteriophagenschwanzprotein p12 aus T4, p12 aus T2 (GenBank Accession Nummer X56555), p12 aus K3 (vgl. Burda et al., 2000, Biol. Chem., Vol. 381, pp. 255 – 258) oder die
- 10 Bakteriophagenschwanzproteine der Phagen Felix 01, P1 oder PB1. Dabei binden zum Beispiel die kurzen Bakteriophagenschwanzproteine der Phagen T4 (p12) und von P1 an Coliforme, das kurze Phagenschwanzprotein von Felix 01 an Salmonellen und das kurze Phagenschwanzprotein von PB1 an Pseudomonaden.
- 15 Phagenschwanzproteine wie p12 oder das P22 tailspike Protein weisen eine hohe Stabilität gegenüber Proteasen, Detergentien, chaotropen Agentien z.B. Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid oder erhöhter Temperatur auf (Goldenberg, D. und King, J.; Temperature-sensitive mutants blocked in the folding or subunit assembly of the bacteriophage P22 tail spike protein. II. Active mutant proteins matured at 30 °C, 1981, J. Mol. Biol. 145, 633-
- 20 651. Miller, S., Schuler, B. und Seckler, R.; Phage P22 tailspike protein: Removal of head-binding domain unmasks effects of folding mutations on native-state thermal stability, 1998, Prot. Sci. 7, 2223-2232.; Miller, S., Schuler, B. und Seckler, R.; A reversibly unfolding fragment of P22 tailspike protein with native structure: The isolated  $\beta$ -helix domain, 1998, Biochemistry 37, 9160-9168.; Burda et al., 2000, Biol. Chem., Vol. 381, pp. 255 – 258). Die Entfernung der
- 25 Phagenkopf- bzw. -Basisplattenbindungsregion dieser Proteine kann eine eventuell bestehende Aggregationssensitivität reduzieren. Interessanterweise sind Einzeldomänen bzw. Untereinheiten dieser Proteine deutlich weniger stabil als die intakten oder nur geringfügig verkürzten Trimere (Miller et al., Prot. Sci. 1998; 7: 2223-2232. Phage P22 tailspike protein: Removal of head-binding domain unmasks effects of folding mutations on native-state thermal stability.; Miller-S, et al., Biochemistry 1998; 37: 9160-9168. A reversibly unfolding fragment of P22 tailspike
- 30 protein with native structure: The isolated  $\beta$ -helix domain), oder aufgrund ihre dreidimensionalen Struktur vermutlich kaum stabil und funktionell exprimierbar: Kristallographische Arbeiten hatten darüber hinaus gezeigt, das Phagenschwanzproteine und Virusrezeptorproteine oft als stark verdrillte Trimere vorliegen wobei der C-Terminus

zurückfalten kann, ein Mechanismus der möglicherweise zusätzlichen Schutz vor Proteasen gewährleistet (Mitraki A, Miller S, van Raaij MJ. Review: conformation and folding of novel Beta-structural elements in viral fiber proteins: the triple Beta-spiral and triple Beta-helix. J Struct Biol. 2002 137(1-2):236-247). Darüberhinaus liegen diese Proteinen im nativen Zustand als Homotrimere vor. Mit drei Bindungsstellen tragen die Trimere über eine Erhöhung der Avidität zu einer festeren Bindung von Bakterien bei.

Wie die Bakteriophagenschwanzproteine an die einzelnen Bakterien binden, soll hier beispielhaft an den „geradzahligen T-Phagen“ (z.B. T4, T2, K3) verdeutlicht werden. In dieser Gruppe gibt es auf Wirtsseite zwei Komponenten, die von den Phagen erkannt werden: Erstens ein Oberflächenprotein, das spezifisch für individuelle Phagen ist, zweitens das Lipopolysaccharid (LPS), das alle gram-negativen Bakterien in abgewandelter Form auf ihrer Aussenseite umgebungsexponiert besitzen. Die langen Schwanzfasern der „geradzahligen T-Phagen“ spielen eine Rolle bei der spezifischen Erkennung der Wirtsbakterien, während das LPS als Rezeptor für die kurzen Schwanzfasern dient. Beim *E.coli* Phagen T4 ist bekannt, dass die durch die langen Schwanzfasern vermittelte spezifische Interaktion mit dem Wirtsbakterium irreversibel wird, sobald auch die kurzen Schwanzfasern an die Bakterienoberfläche gebunden haben. Die kurze Schwanzfaser ist nicht verantwortlich für die genaue Spezifität innerhalb der Wirtsbakteriengruppe und kann deshalb zwischen den verschiedenen „geradzahligen T-Phagen“ ausgetauscht werden.

Bakteriophagenschwanzproteine können leicht rekombinant in großen Mengen produziert und unter Verwendung geeigneter Tags oder über einfache chromatographische Standardtrennverfahren aufgereinigt werden. Phagen wie Wirtsstämme sind größtenteils über Stammsammlungen kommerziell erhältlich, bzw. mit einfachen Mitteln isolierbar. Für das erfindungsgemäße Verfahren können jedoch nicht nur die natürlicherweise vorkommenden Bakteriophagenschwanzproteine verwendet werden, sondern auch deren Varianten. Varianten bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, dass die Bakteriophagenschwanzproteine eine veränderte Aminosäuresequenz aufweisen. Diese können durch Screening der natürlich auftretenden Varianten, oder durch Zufalls-Mutagenese oder gezielte Mutagenese, aber auch durch chemische Modifikation erhalten werden. Die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Bakteriophagenschwanzproteine können durch eine gezielte oder zufällige Mutagenese in ihrer Wirtsspezifität bzw. ihren Bindungseigenschaften an die Trägerstrukturen angepasst werden. Durch die Mutagenese werden Mutationen eingeführt, die

Aminosäureadditionen, -deletionen, -substitutionen oder chemische Modifikationen sein können. Diese Mutationen bewirken eine Veränderung der Aminosäuresequenz in der Bindungsregion der Phagen oder Phagenproteine, mit dem Ziel, Spezifität und Bindungsaffinität an Testbedürfnisse anzupassen, z.B. die Bindung der Bakterien an die isolierten Phagenproteine zu erhöhen oder irreversibel zu machen, um die Waschmöglichkeiten zu verbessern. Darüber hinaus kann eine gentechnische oder biochemische Modifikation der Phagenproteine durchgeführt werden, mit dem Ziel, die gegebenenfalls vorhandene enzymatische Aktivität auszuschalten, um dadurch die Bindung zu verbessern oder irreversibel zu machen.

- 10 Zur Bindung der aufzureinigenden Bakterien und/oder Zellbestandteilen an die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenschwanzproteine im Zwei-Schritt-Verfahren wird die Probe, z. B. eine Übernachtskultur mit den Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenschwanzproteinen in Kontakt gebracht und vorzugsweise inkubiert. Die Inkubation erfolgt bei einer Temperatur im Bereich von 4° bis 90°C, vorzugsweise bei einer Temperatur im Bereich von 4° bis 45°C, besonders  
15 bevorzugt bei einer Temperatur im Bereich von 15° bis 37°C, insbesondere bevorzugt bei einer Temperatur im Bereich von 20° bis 37°C, insbesondere bei RT, für bis zu 6 Stunden, vorzugsweise bis zu 4 Stunden, besonders bevorzugt 2 Stunden, insbesondere 1 Stunde, insbesondere bevorzugt 1 bis 20 Minuten, ganz besonders bevorzugt 3 bis 5 Minuten. Beispielsweise kann die Inkubation 2 bis 120 min bei 4° bis 37°C, bevorzugt für 20 bis 30 min  
20 bei 25°C oder 37°C, besonders bevorzugt für 3 bis 5 min bei 37°C erfolgen.

Anschließend wird die Probe mit festen Trägern in Kontakt gebracht und inkubiert. Feste Träger können z.B. Magnetpartikel (paramagnetisch oder ferromagnetisch), Glaspartikel, Agarosepartikel, Luminexpartikel, Reaktionsgefäße oder Mikrotiterplatten sein.

- 25 Werden Magnetpartikel verwendet, werden diese anschließend der Probe zugegeben. Die Magnetpartikel binden den Bakteriophagen/Bakteriophagenprotein-Bakterien/Zellbestandteil-Komplex, der dann einfach mittels einer Magnetvorrichtung von der Probe abgetrennt und aufgereinigt werden kann. Die Magnetvorrichtung kann dabei an der Außenseite des Gefäßes positioniert sein und entweder zur Anreicherung eingeschaltet werden, so dass die  
30 Magnetpartikel sich an der Gefäßwand sammeln, oder an der Gefäß Außenseite entlanggleiten, so dass die Magnetpartikel sich z. B. am Boden des Gefäßes sammeln. Bevorzugt ist die Anreicherung mit einem Permanentmagneten. Die Magnetvorrichtung kann auch in das Gefäß und in die Probe eintauchen, so dass die Magnetpartikel sich an der Magnetvorrichtung

niederschlagen (die Magnetvorrichtung kann dabei durch eine Pipettenspitze oder ein vergleichbares Disposable bedeckt sein). Im Gegensatz zu Zentrifugations- oder Filtrationstechniken unterliegen die Bakterien nur minimalen Scherkräften und können somit mit hoher Ausbeute bei Bedarf auch aktiv/lebend angereichert werden. Die einfache Handhabung erleichtert einfache schnelle Puffer-/Lösungswechsel und kann sowohl leicht im großen Maßstab durchgeführt werden, wie auch gut automatisiert werden.

Die Magnetpartikel haben einen Durchmesser, der es erlaubt eine ausreichende Menge an Zellen oder Zellbestandteilen je Partikel zu binden. Vorzugsweise haben die Magnetpartikel einen Durchmesser im Bereich von etwa 0,5 bis etwa 4  $\mu\text{m}$ , insbesondere im Bereich von etwa 0,5 bis etwa 2  $\mu\text{m}$ , besonders bevorzugt im Bereich von etwa 0,8 bis etwa 1,8  $\mu\text{m}$ , ganz besonders bevorzugt von etwa 1  $\mu\text{m}$ .

Die Bindung des Bakteriophagen/Bakteriophagenprotein-Bakterien/Zellbestandteil-Komplexes an die festen Träger z.B. Magnetpartikel erfolgt vorzugsweise über geeignete Kopplungsgruppen insbesondere Polypeptide und/oder niedermolekulare Substanzen. Diese Polypeptide können aber auch für die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine spezifische Antikörper, Lektine, Rezeptoren oder Anticaline sein. Ferner können die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine mit niedermolekularen Substanzen z.B. Biotin verknüpft sein, um über diese niedermolekularen Substanzen an Polypeptide z. B. Streptavidin zu binden, die ihrerseits auf dem Träger immobilisiert wurden. Statt Biotin kann ferner der sogenannte Strep-Tag (Skerra, A. & Schmidt, T. G. M. Biomolecular Engineering 16 (1999), 79-86) verwendet werden, der eine kurze Aminosäuresequenz ist und an Streptavidin bindet. Ferner kann der His-Tag verwendet werden, der über zweiwertige Ionen (Zink oder Nickel) oder einen für ihn spezifischen Antikörper (Qiagen GmbH, Hilden) an ein Trägermaterial binden kann. Der Strep-Tag sowie der His-Tag wird vorzugsweise über DNA-Rekombinationstechnologie an die rekombinant hergestellten Bakteriophagenproteine gebunden. Diese Kopplung kann gerichtet, z.B. am N- oder C-Terminus erfolgen. Da für eine effektive Anreicherung insbesondere im Zwei-Schritt-Verfahren eine hohe Bindungskonstante essentiell ist, wird die Kopplungskombination Biotin/Streptavidin mit einem  $K_D$  von  $\sim 10^{-15}\text{M}$  (Gonzales et al. J. Biol. Chem., 1997, 272 (17), pp. 11288-11294) insbesondere bevorzugt. Es hat sich gezeigt, dass diese nicht-kovalente Bindungskombination besser als die zur Verfügung stehenden Antikörper, Anticaline, Rezeptoren und Lektine ist.

Zur Bindung des Komplexes werden die Magnetpartikel mit dem Bakteriophagen/Bakteriophagenprotein-Bakterien/Zellbestandteil-Komplex in Kontakt gebracht und vorzugsweise inkubiert. Die Inkubation erfolgt bei einer Temperatur im Bereich von 4° bis 90°C, vorzugsweise bei einer Temperatur im Bereich von 4° bis 45°C, besonders bevorzugt bei einer Temperatur im Bereich von 15° bis 37°C, insbesondere bevorzugt bei einer Temperatur im Bereich von 20° bis 37°C, insbesondere bei RT, für bis zu 6 Stunden, vorzugsweise bis zu 4 Stunden, besonders bevorzugt 2 Stunden, insbesondere 1 Stunde, insbesondere bevorzugt 1 bis 20 Minuten, ganz besonders bevorzugt 3 bis 5 Minuten. Beispielsweise kann die Inkubation 2 bis 120 min bei 4° bis 37°C, bevorzugt für 20 bis 30 min bei 25°C oder 37°C, besonders bevorzugt für 3 bis 5 min bei 37°C erfolgen.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird mit anderen festen Trägern, die zur Probe zugegeben werden können, entsprechend durchgeführt. Die einzelnen Inkubationsbedingungen und Abtrennschritte müssen für die verschiedenen festen Träger entsprechend angepasst werden. Dies kann einfach durch eine Versuchsreihe durchgeführt werden und bedarf für den Durchschnittsfachmann hier keiner weiteren Erläuterung.

Alternativ kann das Zwei-Schritt-Verfahren auch in entsprechend beschichteten festen Trägern durchgeführt werden, die nicht zur Probe gegeben werden, sondern wobei die Probe auf oder in den festen Träger, z.B. eine Mikrotiterplatte oder ein Reaktionsgefäß gegeben wird. Dabei wird die Probe nach Schritt a) z.B. in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und dort inkubiert, vorzugsweise für etwa 20 bis 30 Minuten bei den ansonsten gleichen Bedingungen wie vorstehend beschrieben. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte oder die inneren Wände eines Reaktionsgefäßes können die gleichen Beschichtungen aufweisen wie vorstehend für die Magnetpartikel beschrieben.

Die Anreicherung bzw. Aufreinigung der Bakterienzellen und/oder Zellbestandteile kann jedoch auch in einem Verfahren durchgeführt werden, das folgende Schritte umfaßt: (Ein-Schritt-Verfahren)

- a) In Kontakt bringen von einer Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen enthaltenden Probe mit einem magnetischen Träger, auf dessen Oberfläche Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine aufgebracht sind, vorzugsweise mit einer Inkubation von etwa drei bis 60 Minuten,
- b) Abtrennen des magnetischen Trägers mit den daran gebundenen Bakterienzellen und/oder

## Zellbestandteilen von der Probe.

Die erfindungsgemäßen Verfahren (Ein-Schritt- und Zwei-Schritt-Verfahren) können zum Beispiel als Zentrifugationsersatz verwendet werden, und somit erstmalig die automatische  
5 Aufreinigung von Bakterienzellen ermöglichen. Damit ist erstmalig eine vollständige Automatisierung zum Beispiel der Genomanalyse möglich, d. h. vom Animpfen der Bakterienkulturen bis zur Ermittlung der Sequenz. Ferner können die erfindungsgemäßen Verfahren zum Beispiel zur Isolierung von Zellbestandteilen, insbesondere von Lipopolysacchariden, Endotoxinen oder Exopolysacchariden verwendet werden.

10

Die nachstehenden Ausführungen über die Kopplung oder Immobilisierung von Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen an die Magnetpartikel (Ein-Schritt-Verfahren) gelten entsprechend auch für die Kopplung oder Immobilisierung von Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen und Polypeptiden an die festen Träger (Zwei-Schritt-Verfahren). Die  
15 Beschichtung der festen Träger mit den vorstehend beschriebenen Polypeptiden oder den Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen kann auf verschiedene Weise erfolgen.

20

Die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine können über kovalente Kopplung an die festen Träger fixiert werden. Die damit mögliche sehr feste Bindung an den Träger ermöglicht den Einsatz harscher Waschbedingungen für das für die Weiterverarbeitung der angereicherten Zellen evtl. erforderliche Waschen der Zellen. Die Kopplung der Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine über Adsorption ist ein sehr einfaches und kostengünstiges Verfahren. Durch Kopplung der Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine über Biotin/Streptavidin oder vergleichbare Ligand/Rezeptor-Systeme sind sowohl Ein-Schritt-, als auch Zwei-Schritt-  
25 Verfahren möglich. Das in diesem Ansatz verwendete Streptavidin kann sowohl über Adsorption als auch über chemische Kopplung fixiert sein. Wichtig bei der Beschichtung ist eine funktionelle Immobilisierung, d.h. die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine verfügen trotz Bindung an die festen Träger über für Bakterien zugängliche Strukturen.

30

Bei der kovalenten Kopplung können die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine z.B. über primäre Aminogruppen oder Carboxylgruppen an bereits vom Hersteller aktivierte Trägermaterialien, z.B. Magnetpartikel von Merck, Estapor, etc über Standardbedingungen, z.B. -NH<sub>2</sub> über Cyanurylechlorid (Russian Chemical Rev., 1964, 33: 92-103), oder -COO<sup>-</sup> über EDC (1-Ethyl-3-[3'-Dimethylaminopropyl]carbodiimid) (Anal. Biochem. 1990, 185: 131-135)

gekoppelt werden. Darüberhinaus können die festen Träger mit geeigneten Verfahren direkt aktiviert werden. Weiterhin kann die Kopplung gerichtet über Maleimid- oder Iodoacetyl-Spacer an z.B. ein N-Terminal eingeführtes Cystein erfolgen.

- 5 Die Immobilisierung der Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine an das Trägermaterial mittels Adsorption kann durch Inkubation einer Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine-Lösung in wässrigem Puffer, z.B. 100mM Tris pH 7.3 oder 100mM Natriumphosphat pH 7.5, PBS (10 mM Natriumphosphat pH 7.4, 150 mM Natriumchlorid), über mehrere Stunden oder über Nacht bei 4°C bis 45°C, vorzugsweise bei 15°C bis 37°C, besonders  
10 bevorzugt bei 20°C bis 37°C, insbesondere bevorzugt bei 37°C oder RT, insbesondere bevorzugt bei 30-65°C für 2-4 h durchgeführt werden. Nach der Adsorption wird die Beschichtungslösung abgenommen und die Trägerstruktur in wässriger, ggfs. gepufferter Lösung gelagert.

- Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein fester Träger, insbesondere ein Magnetpartikel oder  
15 eine Mikrotiterplatte, entweder beschichtet mit Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen oder gegen Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine gerichteten Polypeptiden. Diese Polypeptide können für die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine spezifische Antikörper, Lektine, Rezeptoren oder Anticaline sein. Ferner können die festen Träger mit Streptavidin beschichtet sein.

- 20 Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind Bakteriophagenproteine, an die sogenannte Tags, z.B. der Strep- oder der His-Tag, vorzugsweise an das 3'- oder 5'-Ende, besonders bevorzugt an das 5'-Ende, gekoppelt sind. Bevorzugt ist die Kopplung oder Verknüpfung der Tags mit den Bakteriophagenproteinen über DNA-Rekombinationstechnologie. Herstellung der Nukleinsäure,  
25 umfassend die Sequenz des Bakteriophagenproteins und des Tags und die Herstellung des Expressionsprodukts sind Stand der Technik und brauchen hier nicht gesondert erläutert zu werden. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Nukleinsäuresequenz, die ein Bakteriophagenprotein zusammen mit dem Strep- oder His-Tag codiert. Ein besonders bevorzugtes mit dem Strep- oder His-Tag modifiziertes Bakteriophagenprotein ist das p12-  
30 Protein vom Phagen T4, jedoch sind alle anderen Bakteriophagenproteine aus den in der obigen Tabelle aufgeführten Bakteriophagen ebenfalls bevorzugt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind Bakteriophagenproteine, mit einem Tag, der ein oberflächenexponiertes Cystein zur spezifischen, gerichteten Biotinylierung aufweist, z.B. die



Tags gemäß SEQ ID NO:5, 6 und 7. Ein Beispiel für ein p12 mit Tag ist die in SEQ ID NO:8 aufgeführte Aminosäuresequenz. Bevorzugt ist ein p12 mit einem Tag, insbesondere mit einem Tag mit einem oberflächenexponierten Cystein, insbesondere ein p12 mit dem Tag gemäß SEQ ID NO: 6 und 7. Diese gerichtete Biotinylierung kann zusätzlich durch einen geeigneten Spacer oder Linker vermittelt werden. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Aminosäuren mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO:5, 6 und 7. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Nukleinsäuren, codierend die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:5, 6 und 7.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen Kit zur Anreicherung von Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen, umfassend die erfindungsgemäßen festen Träger, z.B. die Magnetpartikel, Glaspartikel, Agarosepartikel, Reaktionsgefäße oder Mikrotiterplatten sowie die für die Anreicherung der Bakterien und/oder Zellbestandteile notwendigen Lösungen mit den Testreagentien.

Der Kit für eine Anreicherung mit Magnetpartikeln enthält vorzugsweise eine stabilisierte Lösung aus einer p12-Variante mit N-terminal eingeführtem Cysteinrest zur gerichteten Biotinylierung, bzw. NS-T4p12 (oder T4p12-bio) 1mg/ml in 100 mM TrisHCl pH8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05 % Tween20 supplementiert mit Proteaseinhibitormix (Sigma) als Lösung (bevorzugte Lagerung bei 4°C) oder als Lyophilisat. Ferner eine Partikellösung bestehend aus Streptavidin- oder Streptaktin-beschichteten Magnetpartikeln in stabilisierender Lösung (PBST mit Natriumazid 0.005%).

Der Kit für eine Anreicherung mit Mikrotiterplatten enthält vorzugsweise eine stabilisierte Lösung aus einer p12-Variante mit N-terminal eingeführtem Cysteinrest zur gerichteten Biotinylierung, bzw. NS-T4p12 (oder T4p12-bio) 1mg/ml in 100 mM TrisHCl pH8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05 % Tween20 supplementiert mit Proteaseinhibitormix (Sigma) als Lösung (bevorzugte Lagerung bei 4°C) oder als Lyophilisat. Ferner eine Streptavidin- oder Streptaktin-beschichtete Mikrotiterplatte.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als einschränkend aufzufassen. Sofern nicht anders angegeben, wurden molekularbiologische Standardmethoden verwendet, wie z.B. von Sambrook et al., 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben.

1. Die Reinigung von Wildtyp T4 p12 erfolgte nach der von Burda, M.R. & Miller, S. Eur J Biochem. 1999 265 (2), 771-778 beschriebenen Vorschrift.

2. Konstruktion von p12 mit N-terminalem Strep-Tag (N-Strep-p12): Mittels PCR wurde an das 5'-Ende des T4p12-Gens die Nukleotidsequenz für den Strep-Tag (US patent 5,506,121) eingeführt. Hierfür wurde für das 5'-Ende des p12-Gens ein Primer konstruiert (5'-GAA GGA ACT AGT CAT ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC AGT AAT AAT ACA TAT CAA CAC GTT-3' (SEQ ID NO:1), der die Nukleotidsequenz des Strep-Tags an seinem 5'-Ende beinhaltet (kursiv in der Sequenz) und eine Restriktionsschnittstelle (*Nde*I, unterstrichen in der Sequenz) derart besitzt, dass das Gen im richtigen Leseraster in das Expressionsplasmid eingesetzt werden kann. Für das 3'-Ende des p12-Gens wurde ein Primer konstruiert, der hinter dem p12-Gen eine *Bam*H I Restriktionsschnittstelle (kursiv in der Sequenz) einführt (5'-ACG CGC AAA GCT TGT CGA CGG ATC CTA TCA TTC TTT TAC CTT AAT TAT GTA GTT-3'), (SEQ ID NO:2). Die PCR wurde mit 40 Cyclen (1 min 95°C, 1 min 45°C und 1 min 72°C) durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Bam*HI geschnitten und das gewünschte Fragment nach Größenfraktionierung über ein Agarosegel und Elution aus dem Gel in die *Nde*I und *Bam*HI site des Expressionsplasmids pET21a (Novagen, Merck Eurolab, Darmstadt) eingesetzt. Die Sequenz des N-Strep-p12-Gens wurde über DNA-Sequenzierung auf seine Richtigkeit hin überprüft. Die weiteren Schritte zum Plasmid pNS-T4p12p57 wurden wie von Burda, M.R. & Miller, S. (Eur J Biochem. 1999 265 (2), 771-778) für T4p12p57 beschrieben durchgeführt. Das Plasmid pNS-T4p12p57 wurde dann in den Expressionsstamm BL21 (DE3) (Novagen, Merck Eurolab, Darmstadt) transformiert.

25

3. Einfügen eines N-terminalen Cysteinrests in N-Strep-p12 (N-Strep-S3C-p12 und N-Strep-S14C-p12): Die Einfügung eines N-terminalen Cysteinrestes (fett markiert) wurde wie unter 2. beschrieben durchgeführt, wobei dafür zwei neue Primer für das 5'-Ende konstruiert wurden. Für das N-Strep-S3C-p12 wurde der Primer 5'-GAA GGA ACT AGT CAT ATG GCT **TGT** TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC AGT AAT AAT ACA TAT CAA CAC GTT-3' (SEQ ID NO:3), für das N-Strep-S14C-p12 wurde der Primer 5'-GAA GGA ACT AGT CAT ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC **TGT** AAT AAT ACA TAT CAA CAC GTT-3' (SEQ ID NO:4) verwendet.

30

4. Reinigung von N-Strep-p12 Protein: Der *E.coli* Stamm BL21(DE3) mit dem Plasmid pNS-T4p12p57 wurde in 2 l Schüttelkulturen (LB-Medium mit Ampicillin 100 µg/ml) bis zu einer OD600 von 0.5-0.7 bei 37°C gezogen und die Expression des N-Strep-p12-Proteins wurde durch Zugabe von 1mM IPTG (Isopropyl-β-thio-galactopyranoside) induziert. Nach Inkubation bei 37°C für 4h wurden die Zellen abgeerntet. Geerntete Zellen aus 10 l Kultur wurden in 50 ml Natriumphosphat, 20 mM pH 7.2, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 M NaCl aufgenommen, durch dreimalige French-Press-Behandlung (20.000 psi) aufgebrochen und anschließend 30 min bei 15.000 rpm (SS34) abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen im gleichen Puffer wurde das N-Strep-p12 Protein aus dem Pellet durch Rühren für 30 min in 40 mM TrisHCl pH 8.0, 10 mM EDTA extrahiert, der Ansatz für 30 min bei 15.000 rpm (SS34) zentrifugiert und das abgelöste NS-p12 im Überstand bei 4°C gelagert. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt. und die vereinigten Überstände wurden auf eine Streptactin-Affinitätssäule (15 ml), äquilibriert mit Puffer „W“ (100 mM TrisHCl pH 8, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl), aufgetragen (IBA GmbH, Göttingen). Nach Waschen mit 5 Säulenvolumina Puffer „W“ wurde mit 3 Volumina Puffer „W“ mit 2.5 mM Desthiobiotin in Puffer „W“ eluiert. Nach mehrmaliger Dialyse gegen Puffer „W“ und Aufkonzentration wurde über SDS-PAGE und UV-Spektroskopie (Burda et.al. 1999) die Konzentration und Reinheit von N-Strep-T4p12 ermittelt. Aus 10 Liter Kultur wurden so ca. 100 mg N-Strep-T4p12 gereinigt.

Name	Sequenz des Tag	
Nstrep-p12	MASWSHPQFEKGAS	SEQ ID NO: 5
Nstrep-p12-S3C	MACWSHPQFEKGAS	SEQ ID NO: 6
Nstrep-p12-S14C	MASWSHPQFEKGAC	SEQ ID NO: 7

20

5. Alternative Reinigung von p12: Hierzu wurde das Zellpellet (aus 10 l Kultur, BL21 (DE3) transformiert mit dem Plasmid pNS-T4p12p57 oder pT4p12p57) in Puffer 1, (10mM Natriumphosphat pH 9, 500 mM NaCl, 4mM MgCl<sub>2</sub>) aufgenommen und per Frenchpress (wie unter 3 beschrieben) aufgeschlossen. Anschliessend wurde das Material bei 20000rpm (SS-34) 45 Minuten zentrifugiert und das Pellet in ca. 25ml Puffer 1 resuspendiert (= gewaschen). Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt und das Pellet mit 25ml Puffer 2: (50mM NaPi pH 5, 100mM NaCl, 25mM EDTA) extrahiert. Hierfür wurde das resuspendierte Pellet zur Extraktion 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und danach abzentrifugiert (20000rpm (SS-34) für 45 Minuten). Diese Extraktion wurde bei Bedarf 2 mal wiederholt. Im Anschluss wurden die

30

Überstände der Extraktion vereinigt und direkt auf eine Anionentauscher-Säule (ResourceS, Pharmacia) aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 15 mM Na Hydrogenphosphat, 15 mM Na Formiat, 30 mM Na Acetat, pH 5.0, 50 mM NaCl verwendet. Die Elution erfolgte über einen linearen Salzgradienten von 50 mM NaCl bis 600 mM NaCl im Laufpuffer. Das gereinigte p12 wurde anschließend zur Lagerung gegen 50 mM Tris pH 8.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA oder PBS dialysiert, in Aliquots in N<sub>2</sub> gefroren und bei -20°C gelagert.

6. Biotinylierung von p12: Zur Biotinylierung des p12 Proteins wurden entweder EZ-Link<sup>TM</sup>Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin oder EZ-Link<sup>TM</sup>TFP-PEO-Biotin von Pierce, USA verwendet und die Biotinylierung nach den vom Hersteller angegebenen Vorschriften durchgeführt. Dabei wurden für die Biotinylierung ca. 30 Moleküle Biotin pro p12-Trimer eingesetzt. Die Kopplung von Biotin wurde anschließend mit dem HABA-Assay (Savage MD, Mattson G, Desai S, Nielander GW, Morgensen S und Conklin EJ, 1992, Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook, Pierce, Illinois) überprüft und quantifiziert. Durchschnittlich wurden letztendlich 5-10 Moleküle Biotin pro p12-Trimer gebunden.

7. Zur Biotinylierung des N-terminal eingeführten Cysteins wurde EZ-Link<sup>TM</sup>-PEO-Maleimid-Biotin und EZ-Link<sup>TM</sup>PEO-Iodoacetyl-Biotin von Pierce, USA nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt. Die Reaktion wurde wie unter 5 beschrieben überprüft.

8. Biotinylierung des Bakteriophagen T4: Der Bakteriophage wurde nach Bachrach U und Friedmann A (1971) Practical procedures for the purification of bacterial viruses, Appl Microbiol 22: 706-715, gereinigt. Der gereinigte Phage wurde gegen PBS dialysiert und mit EZ-Link<sup>TM</sup>Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin oder EZ-Link<sup>TM</sup>TFP-PEO-Biotin von Pierce, USA nach Angaben des Herstellers in einem Verhältnis von 100-100000 Biotinmolekülen pro Phage markiert.

9. p12-abhängige Ernte von *E.coli* nach dem 1-Schritt-Verfahren und dem 2-Schritt-Verfahren (Fig. 1): Bei der Bindung nach dem 1-Schritt-Verfahren (VC) wurde das N-Strep-p12 Protein 1h mit den magnetischen Streptavidinbeads (10 µg Protein / 50 µl 1% Beads) inkubiert und die Beads wurden anschließend 3x mit PBST gewaschen. Für die Zellbindung wurden je 200 µl einer 1 zu 10 in LB verdünnten *E.coli* ÜN-Kultur *E.coli* Kultur (ca. 1 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml) pro well in einer Mikrotiterplatte mit 10 µl der N-Strep-p12 beschichteten Beads vermischt und für verschiedene Zeiten (Fig. 1) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Beads

mit den gebundenen Zellen mittels eines Magnetseparators (Bilatec AG, Mannheim) für 3-5 min an der Wandung der Wells konzentriert. Die Beads wurden 3x mit PBST gewaschen, und anschließend wurde die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität (Apte SC et al., 1995, Water res. 29, 1803-06) der an den Beads verbliebenen Zellen ermittelt. Bei der Bindung nach dem 2-Schritt-Verfahren wurde eine 1 :10 Verdünnung einer *E.coli* ÜN-Kultur *E.coli* Kultur (ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/ml) für 1 h (in weiteren Versuchen für 1 min, 3 min, 10 min, 30 min) mit dem N-Strep-p12 Protein (10  $\mu$ g Protein / ml Zellsuspension) bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200  $\mu$ l des Protein-Zellgemisches zu 10  $\mu$ l 1% magnetischer Streptavidinbeads gegeben und für die in der Fig.1 angegebenen Zeiten bei RT inkubiert. Zur Ermittlung der gebundenen Zellen wurde im weiteren wie mit dem 1-Schritt-Verfahren verfahren.

10. T4 abhängige Bindung von *E.coli* nach dem 1-Schritt-Verfahren (VC) und nach dem 2-Schritt-Verfahren (VIK) (Fig. 2). Bei der Bindung nach dem 1-Schritt-Verfahren (VC) wurde der biotinylierte Phage T4 (100 Biotinmoleküle / Phage) für 1 h an 1% Streptavidin-Beads gebunden ( $10^{10}$  PFU / ml 1% Beads) und die Beads wurden anschließend 3x mit PBST gewaschen. Nach der Zellbindung (25  $\mu$ l Phagenbeads /ml Zellsuspension) für 2h wurden die Beads gewaschen und die gebundenen *E.coli* über die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität nachgewiesen (Angaben in relativen Einheiten). Bei der Bindung nach dem 2-Schritt-Verfahren (VIK) wurden die Zellen mit dem biotinylierten Phagen für 1h inkubiert ( $2.5 \times 10^8$  PFU / ml Zellsuspension) und die Mischung anschließend für 2h mit den Streptavidin-Beads (25  $\mu$ l 1% Beads/ ml Zellsuspension) inkubiert. Das weitere Vorgehen war wie beim 1-Schritt-Verfahren. Während der Dauer der Inkubation von Phage und Bakterien wurden dem Medium die Antibiotika Rifampicin (25  $\mu$ g / ml), Chloramphenicol (25  $\mu$ g / ml) und Tetracyclin (2  $\mu$ g / ml) zugesetzt.

11. Ernte von *E.coli* Zellen nach dem 2-Schritt-Verfahren aus verschiedenen Wachstumsmedien (Fig. 3): Die *E.coli* Stämme LE392 und JM83 wurden ÜN in dem jeweiligen Medium angezogen. Zu 200  $\mu$ l Zellsuspension wurde N-Strep-p12 (10  $\mu$ g / ml Zellsuspension) gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 10  $\mu$ l 1% Streptavidinbeads zugegeben, vermischt durch 3maliges Aufziehen mit der Pipette und weitere 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien-Beads-Komplexe mittels des o.a. Magnetseparators für 3-5 min abgezogen und die im Überstand verbliebenen Zellen wurden über die Streuung des Überstandes bei 600 nm bestimmt.

12. Plasmidisolierung aus *E.coli* nach Zellernte über das 2-Schritt-Verfahren (Fig. 4). Je 300

µl einer *E.coli* ÜN-Kultur, die das Plasmid pUC19 beinhaltet, wurde nach dem 2-Schritt-Verfahren wie unter 9 beschrieben abgeerntet. Nach Abzug der Zellen mittels des o.a. Magnetseparators wurde aus den Zellen das Plasmid einmal über ein Festphasenextraktionsverfahren (QIAprep, Qiagen, Hilden) und auch über ein Verfahren mit magnetischen Beads (Bilatec, Mannheim) nach den Angaben der Hersteller isoliert.

13. Anreicherung von *E.coli* Zellen aus 10 ml Kulturvolumen über N-Strep-p12 und über den biotinylierten Bakteriophagen T4-bio nach dem 2-Schritt-Verfahren (Fig. 5): Zur Anreicherung mit N-Strep-p12 wurden 10 ml *E.coli* Kulturen mit  $10^9$ ,  $10^8$  und  $10^7$  Zellen pro ml mit 30 µg, bzw. jeweils 6 µg Protein versetzt und 1h bei 37°C gerollt. Zur Anreicherung mit T4-bio wurden 10 ml Kulturen mit  $10^9$ ,  $10^8$  und  $10^7$  Zellen pro ml mit jeweils  $10^{10}$  T4-bio Phagen und 10 µg Rifampicin / ml und 2 µg Tetracyclin / ml versetzt und 1h bei 37°C gerollt. Anschließend wurde zu den Ansätzen 100 µl 1% magnetische Streptavidinbeads gegeben und für eine weitere Stunde gerollt. Mittels eines Magneten (ABgene, Hamburg) wurden die an die magnetischen Beads gebundenen Zellen abgetrennt, 3x mit PBST gewaschen und über ihre β-Galactosidaseaktivität nachgewiesen.

14. Lebend-Ernte von *E.coli* über das 2-Schritt-Verfahren mit biotinyliertem p12 (Fig. 6): *E.coli* Zellen (200 µl einer Kultur) wurden nach dem 2-Schrittverfahren wie in Beispiel 9 geerntet (10 µg biotinyliertes p12 / ml Zellkultur und 10 µl 1% StreptavidinBeads / ml Zellkultur) und die Beads 2x mit PBST gewaschen. Anschließend wurde die β-Galactosidase-Aktivität bestimmt und das Wachstum der Zellen nach 2h über die Streuung bei 600 nm im Photometer bestimmt.

15. Selektivität der N-Strep-p12-abhängigen Ernte (Fig. 7 und 8): Je 200 µl einer ÜN-Kultur von verschiedenen *E.coli* Stämmen (Fig. 7) sowie von verschiedenen Bakterienstämmen (Fig. 8) wurden nach dem 2-Schritt-Verfahren (wie in Beispiel 9 beschrieben) abgeerntet. Nach Konzentration der Beads im Magnetseparator wurde die abgeerntete Zellmenge über die Streuung des Überstandes bei 600nm bestimmt.

16. Selektive Bindung von *E.coli* an magnetische Streptavidinbeads über T4-bio und Nachweis von *E.coli* über FITC-markiertes p12 (Fig. 9). Das p12 Protein wurde mit FITC (Molecular Probes, Leiden) gemäß den Angaben des Herstellers markiert und gegen PBS dialysiert. Zu einer Mischkultur (ca.  $10^{8-9}$  Zellen / ml) aus *E.coli* und *Serratia marcescens* wurde FITC-markiertes p12 gegeben (5 µg / ml). Nach 5 min Inkubation bei RT im Dunklen wurden

$10^9$  T4-bio Phagen und Rifampicin ( $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ), Chloramphenicol ( $25 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) und Tetracyclin ( $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) zugegeben. Als Kontrolle wurde nicht biotinylierter T4 Phage eingesetzt. Nach Inkubation für 10 min wurden 1% Streptavidin Beads ( $10 \mu\text{l} / \text{ml}$ ) zugegeben und die Ansätze wurden unter dem Mikroskop betrachtet (Fig. 9).

5

17. Bestimmung der Nachweisgrenze für die N-Strep-p12 abhängige Isolierung von *E.coli* Zellen nach dem 2-Schritt-Verfahren (Fig. 10): Je  $300 \mu\text{l}$  von Verdünnungen einer *E.coli* ÜN-Kultur ( $10^2$ - $10^5$  Zellen / ml) wurden in Mikrotiterplatten mit N-Strep-p12 ( $10 \mu\text{g}$  Protein / ml) für 1h inkubiert. Anschließend wurden magnetische Streptavidinbeads ( $100 \mu\text{l}$  1% Beads / ml) zugegeben, gemischt und die gebundenen Zellen mittels eines Magneten (Bilatek, Mannheim) pelletiert. Die Beads wurden 3x mit PBST gewaschen. Der Nachweis der *E.coli* Zellen erfolgte über Fluoreszenz- und Lumineszenz-Substrate für die  $\beta$ -Galactosidase.

10

18. Chemische Kopplung von T4p12 an magnetische Beads (Fig. 11):  $150 \mu\text{l}$  1%iger magnetischer Beads (EM2-100/40, Merck Eurolab, France) wurden 3x mit 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6 gewaschen und in  $40 \mu\text{l}$  des Puffers aufgenommen. Nach Zugabe von  $120 \mu\text{l}$  EDC-Lösung (1-Ethyl-3-(3Dimethylaminopropyl)carbodiimide) ( $30 \text{mg} / \text{ml}$ ) und Inkubation für 5 min bei RT wurden  $160 \mu\text{l}$  T4p12 Lösung ( $0.7 \text{mg}$  Protein / ml 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6) zupipettiert, gemischt und der Ansatz 2 h bei RT inkubiert. Durch Zumischung von 1 Volumen 0.2 M Tris-HCl, pH 7, 0.05% Tween 20, wurde die Reaktion ÜN bei  $4^\circ\text{C}$  abgestoppt. Anschließend wurden die Beads 4x mit PBST gewaschen und mit PBST auf 1% eingestellt. Die Kopplung von p12 an die Beads wurde mittels eines p12-spezifischen Antiserums getestet. Die Bindeaktivität der p12-Beads wurde über die Bindung von *E.coli* Zellen nach dem 1-Schritt-Verfahren ermittelt. Hierfür wurden  $3 \mu\text{l}$  1% p12-Beads mit  $200 \mu\text{l}$  einer hundertfach verdünnten *E.coli* ÜN-Kultur (ca.  $1 \times 10^7$  Zellen/ml) 5 min inkubiert, 3x mit PBST gewaschen und die gebundenen Zellen wurden über ihre  $\beta$ -Galactosidaseaktivität nachgewiesen (Fig. 11).

20

25

19. Adsorption von p12 an verschiedene magnetische Polyvinylalkohol (PVA) Beads (Fig. 12):  $200 \mu\text{l}$  2%ige PVA Beads (Chemagen AG, Baesweiler) wurden mit unterschiedlichen Mengen T4p12 ( $0$ - $5 \mu\text{g}$  Protein / mg Beads) in 100 mM TrisHCl, pH 8, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl ÜN bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Beads 2x mit PBST gewaschen und in PBS auf 2% aufgenommen. Die funktionale Bindung von T4p12 an die Beads wurde über die Bindung von *E.coli* Zellen ermittelt. Hierzu wurden  $200 \mu\text{l}$  einer *E.coli* ÜN-Kultur mit  $10 \mu\text{l}$

30

p12-Beads vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Abzug der gebundenen Zellen wurde die Streuung des Überstandes bei 600 nm vermessen und zur Streuung der *E.coli* Kultur vor Zugabe der Beads in Relation gesetzt.



## Patentansprüche

1. Verfahren zur selektiven Aufreinigung von Bakterienzellen oder Zellbestandteilen, umfassend die folgenden Schritte:
  - 5 a) In Kontakt bringen von einer Bakterienzellen oder Zellbestandteile enthaltenden Probe mit Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen,
  - b) anschließende Inkubation der Probe, enthaltend die Bakterienzellen oder Zellbestandteile und die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine, mit einem festen Träger, wobei der feste Träger eine oder mehrere verschiedene auf seiner Oberfläche die Bakterien und/oder Bakteriophagenproteine bindende Kopplungsgruppe(n) aufweist,
  - 10 c) Trennen des festen Trägers mit den daran über die Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine gebundenen Bakterienzellen oder Zellbestandteilen von der Probe.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Kopplungsgruppe ein Lektin, Rezeptor oder  
15 Anticalin ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Kopplungsgruppe ein Streptavidin oder Avidin ist und die Bakteriophagenproteine mit Biotin oder einem Strep-Tag gekoppelt sind.
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der feste Träger ein Magnetpartikel, Agarosepartikel, Glaspartikel, Luminexpartikel, Reaktionsgefäß oder eine Mikrotiterplatte ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei zwei oder mehr verschiedene  
25 Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine zugegeben werden.
6. Verfahren zur selektiven Aufreinigung von Bakterienzellen oder Zellbestandteilen, umfassend die folgenden Schritte:
  - a) In Kontakt bringen von einer Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen enthaltenden  
30 Probe mit einem Magnetpartikel, auf dessen Oberfläche Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteine aufgebracht sind,
  - b) Abtrennen des Magnetpartikels mit den daran gebundenen Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen von der Probe.

7. Magnetpartikel beschichtet mit Bakteriophagen und/oder Bakteriophagenproteinen.
8. Magnetpartikel nach Anspruch 7, wobei die Bakteriophagen und/oder die Bakteriophagenproteine ausgewählt sind aus der Gruppe

5

0c1r, 10tur, L2, L51, M1, MVG51, MV-L1, O1, SpV1, V1, V1, V2, V4, V5, 108/016, 119, 29, 37, 43, 51, 59.1, A1-Dat, Aeh2, Bir, M1, MSP8, ø115-A, ø150A, ø31C, P-a-1, PhiC, R1, R2, SK1, SV2, VP5, Ap3, Ap4, Mm1, Mm3, Mm4, Mm5, phiUW 51, 43, 44RR2.8t, 65, Aeh1, PM1, PIIBNV6, PS8, psi, PT11, 8764, A5/A6, A6, PM2, W11, W2, W4, W7, 1A, alpha, AP50, BLE, F, G, GA-1, II, IPy-1, mor1, MP13, MP15, ø105, ø29 (phi 29), øNS11, PBP1, PBS1, SP10, SP15, SP3, SP8, SPP1, SPß, SPY-2, SST, type,168, W23, SP50, W23, SP01, MAC-1, MAC-2, MAC-4, MAC-5, MAC-7, Tb, øCb12r, øCb2, øCb23r, øCb4, øCb5, øCb8r, øCb9, øCP18, øCP2, øCr14, øCr28, O11, O13, O2, O3, O5, O6, O8, 1, phi.CPG1, Ceß, F1, HM2, HM3, HM7, 7/26, A, A19, AN25S-1, Arp, AS-1, BL3, CONX, MT, N1, øA8010, S-6(L), ß, A-4(L), AC-1, LPP-1, S-2L, S-4L, SM-1, P1, T1, Tula, Tulb, Tull,1ø3, 1ø7, 1ø9, 2D/13, Ae2, alpha10, alpha3, BE/1, BF23, dA, delta1, delta6, dø3, dø4, dø5, Ec9, eta8, f1, fd, G13, G14, G4, G6, HK022, HK97, HR, lambda, M13, M13mp18, M20, MM, MS2, Mu, O1, ø80, øA, øR, øX174, PA-2, P1, P1D, P2, P22, Qß, R17, S13, St-1, T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, WA/1, WF/1, WW/1, zeta3, ZG/2, ZJ/2, C21, omega 8, U3, chi, FC3-9, µ2, 01, 11F, 121, 1412, 3, 3T+, 50, 5845, 66F, 7480b, 8893, 9, 9266, a1, alpha15, b4, B6, B7, Beccles, BZ13, C-1, C16, C2, C-2, DdVI, Esc-7-11, f2, fcan, FI, Folac, fr, GA, H, H-19J, I2-2, Ialpha, ID2, If1, If2, Ike, JP34, JP501, K19, KU1, M, M11, M12, MS2, NL95, ø92, øI, Øli, Omega8, pilHalpaa, PR64FS, PRD1, PST, PTB, R, R17, R23, R34, sd, SF, SMB, SMP2, SP, ß, ST, tau, tf-1, TH1, TW18, TW28, Vill, VK, W31, X, Y, ZG/1, ZIK/1, ZJ/1, ZL/3, ZS/3, AP3, C3:, 1b6, 223, fri, hv, hw222a, øFSW, PL-1, y5, 1, 643, c2, kh, ml3, P008, P127, 1358, 1483, 936, 949, BK5-T, c2, KSY1, P001, P008, P107, P335, PO34, PO87, pro2, 4211, psi M2 (ΨM2), N1, N5, Br1, C3, L3, I3, lacticola, Leo, ø17, R1-Myb, N13, N18, N24, N26, N36, N4, N5, X1, X10, X24, X3, X5, X6, D3, D4, 22, 32, AU, C-2, P1, P2, P3, P4, Phi CT, phi CTX, PB-1, 12S, 7s, D3, F116, gh-1, gh-1, Kf1, M6, ø1, øKZ, øW-14, Pf1, W3, 2, 16-2-12, 2, 317, 5, 7-7-7, CM1, CT4, m, NM1, NT2, ø2037/1, ø2042, øgal-1-R, WT1, Mp1, MP2, W1, epsilon15, Felix 01, 16-19, 7-11, H-19J, Jersey, N4, SasL1, Vil, ZG/3A, San21, A3, A4, P22, 4, C1/TS2, Sp1, 107, 187, 2848A, 3A, 44AHJD, 6, 77, B11-M15, Twort, 182, 2BV, A25, A25-24, A25-omega8, A25-PE1, A25-VD13, CP-1, Cvir, H39, P23, P26, phi A.streptomycini III, phi8238, phiC31, S1, S2, S3, S4, S6, S7, SH10, Tb1, Tb2, Ts1, 06N-22P, 06N-58P, 06N-58P, 4996, alpha3alpha, I, II, III, IV, kappa, nt-1, OXN-100P, OXN-52P, v6, Vf12, Vf33, VP1, VP11, VP3, VP5, X29, Cf, Cf1t, RR66, 8/C239, phiYeO3-12, YerA41.

35

9. Magnetpartikel nach Anspruch 7 oder 8 mit einem Durchmesser von etwa 0,5 bis etwa 4 µm oder etwa 0,8 bis etwa 1,8 µm.

10. Bakteriophagenprotein, umfassend einen Strep-Tag oder einen His-Tag.

11. Bakteriophagenprotein nach Anspruch 10, wobei der Tag eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 5, 6 oder 7 aufweist.
- 5 12. Bakteriophagenprotein nach Anspruch 10 oder 11, wobei das Bakteriophagenprotein das p12-Protein des Phagen T4 ist.
13. Bakteriophagenprotein nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei das Bakteriophagenprotein mittels DNA-Rekombinationstechnik hergestellt ist.
- 10 14. Nukleinsäure codierend ein Bakteriophagenprotein nach einem der Ansprüche 10 bis 13.
15. Aminosäure mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 6, 7 oder 8.
- 15 16. Verwendung der Magnetpartikel nach einem der Ansprüche 7 bis 9 oder der Bakteriophagenproteine nach einem der Ansprüche 10 bis 13 zur Isolierung von Nukleinsäuren, insbesondere zur Plasmidpräparation, von Zellbestandteilen, insbesondere von Lipopolysacchariden, Endotoxinen oder Exopolysacchariden.
- 20 17. Kit zur Aufreinigung von Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen, umfassend die Magnetpartikel nach einem der Ansprüche 7 bis 9 und/oder der Bakteriophagenproteine nach einem der Ansprüche 10 bis 13.

Fig. 1

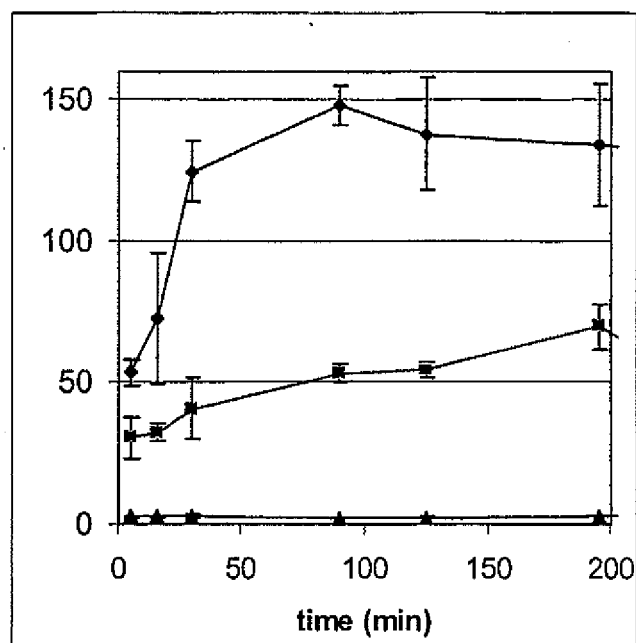


Fig. 2

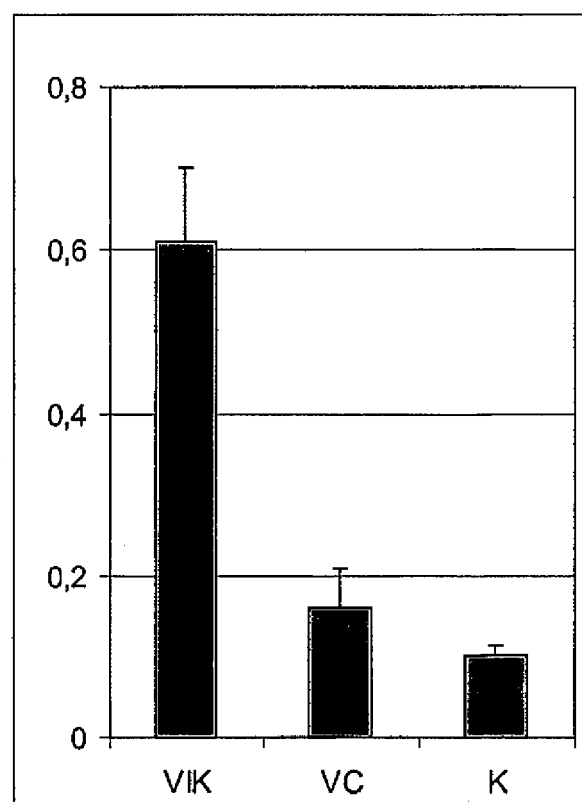


Fig. 3

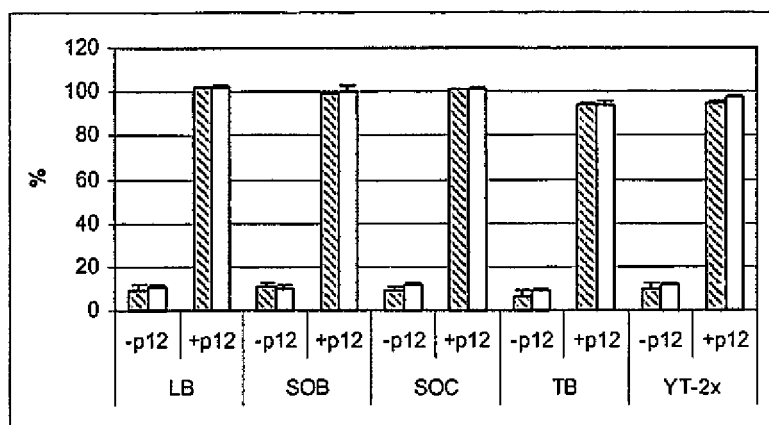
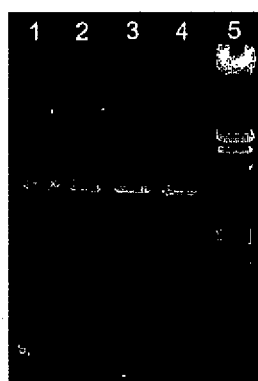
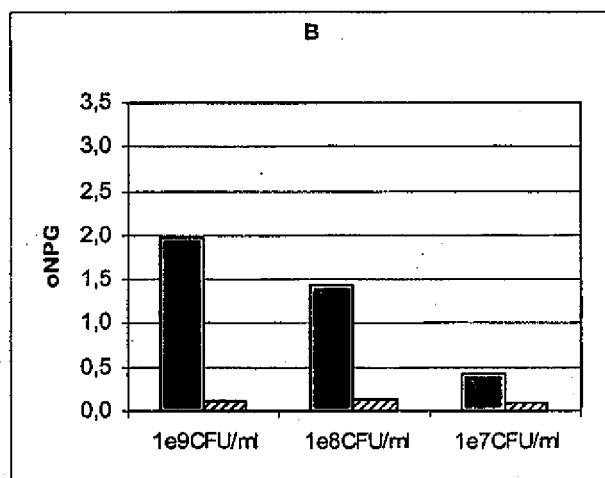
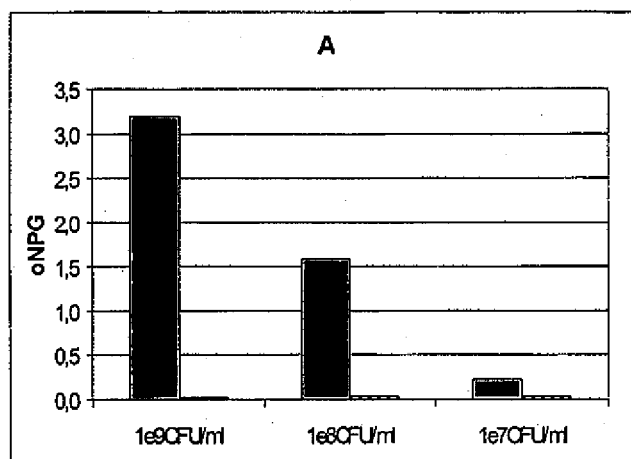


Fig. 4



Figur 5



Figur 6

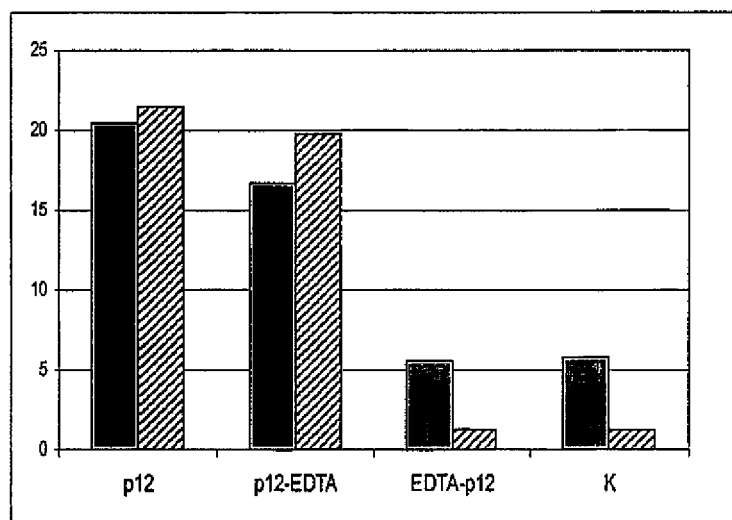


Fig. 7

A

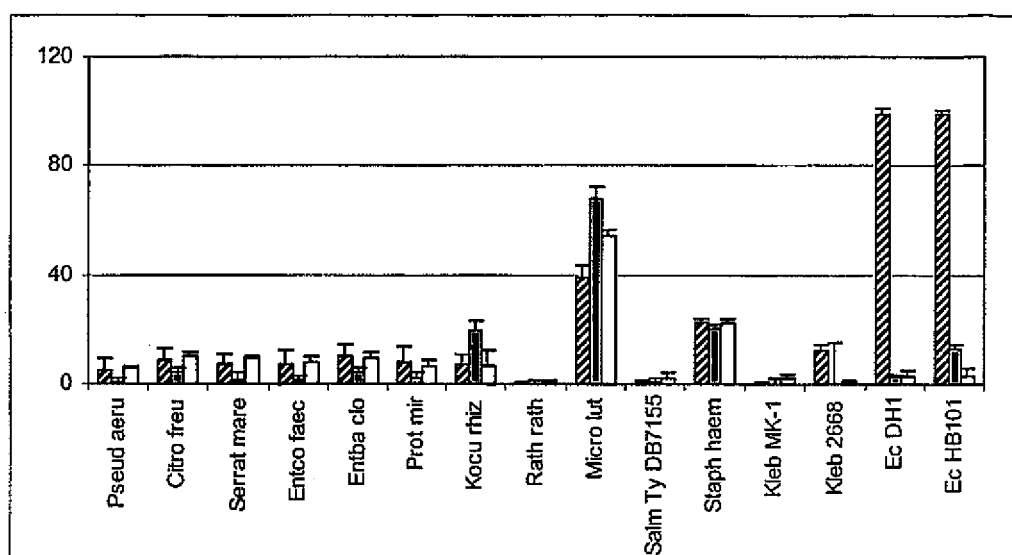
Bakterien	Stamm	Biacore	2-Schritt-Verfahren
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	B	+	+
DH1	K-12	n.d.	+
DH5 $\alpha$	K-12	n.d.	+
DH10b	K-12	+	+
GM2163	K-12	n.d.	+
HB101	K-12	+	+
Inv $\alpha$ F	K-12	n.d.	+
JM83	K-12	n.d.	+
JM109	K-12	n.d.	+
LE392	K-12	+	+
NM522	K-12	n.d.	+
sure	K-12	+	+
TG2	K-12	n.d.	+
Top10	K-12	n.d.	+
XL1-Blue	K-12	n.d.	+
D21		+	+
D21e7		+	+
D21e8		+	+
D21f1		+	+
W3110	K-12	+	n.d.
DSM 613	B	+	+
DSM 5210	K-12	n.d.	+
DSM 13127	C	+	+
MC 4100	K-12	+	+

B

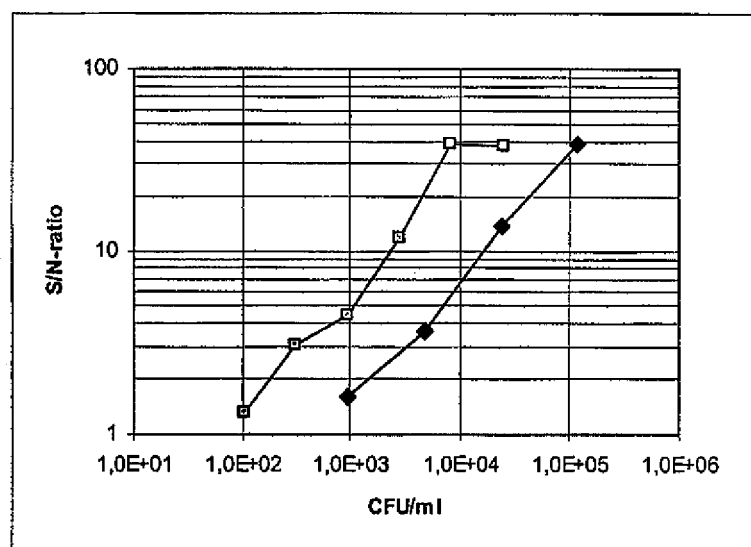
Bakterien	Biacore	2-Schritt-Verfahren
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	n.d.	-
<i>Klebsiella</i> MK-1	n.d.	-
<i>Klebsiella</i> 2668	n.d.	(-)
<i>Serratia marcescens</i>	n.d.	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-
<i>Kocuria rhizophila</i>	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	unspezifisch
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	n.d.	-
<i>Rathayibacter rathayi</i>	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	n.d.	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	n.d.	unspezifisch



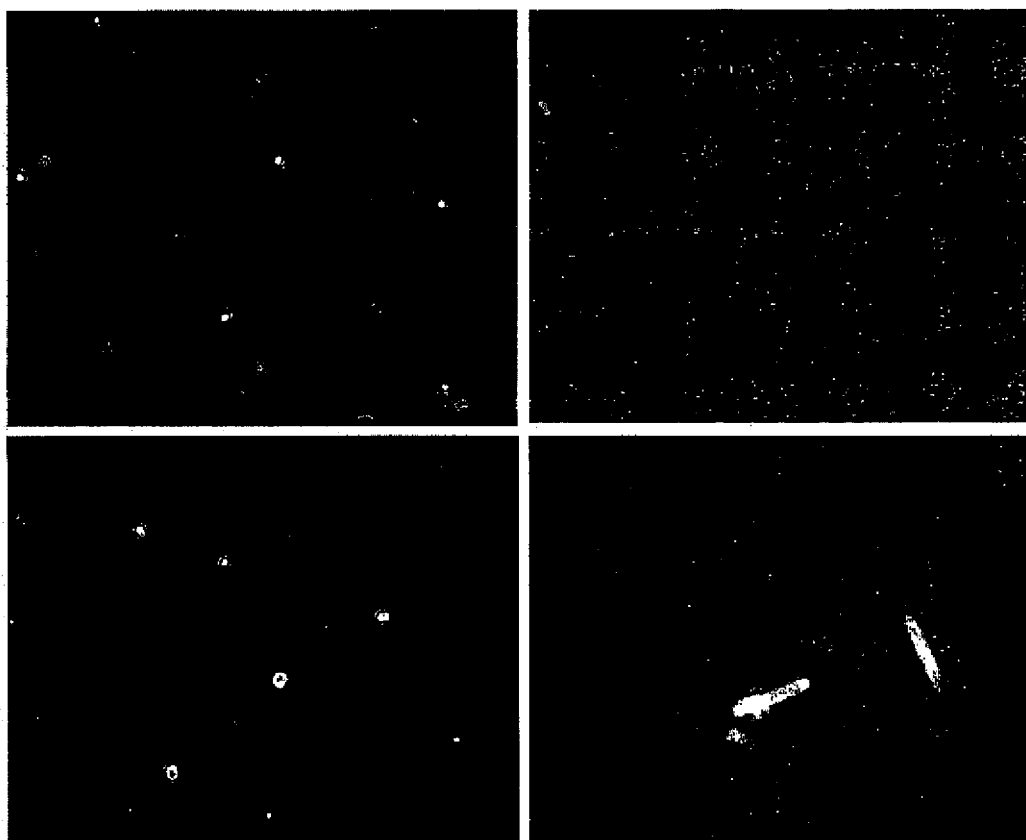
Figur 8



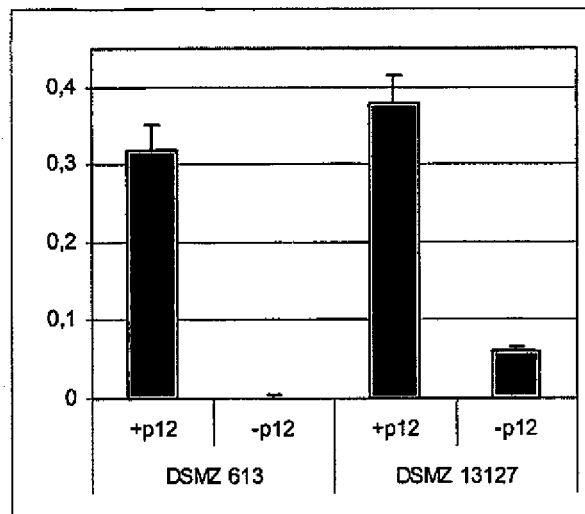
Figur 10



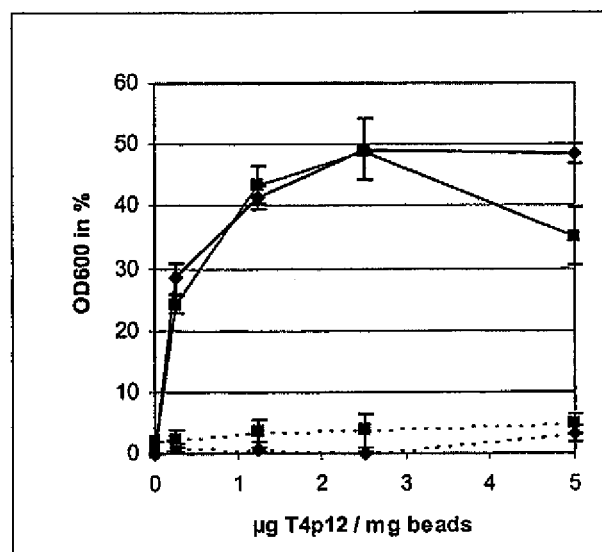
Figur 9



Figur 11



Figur 12



## SEQUENCE LISTING

<110> PROFOS AG

5 <120> Verfahren zur Aufreinigung von Bakterienzellen und Zellbestandteilen

<130> PRO-004 PCT

10 <150> DE 101 29 815

<151> 2001-06-24

<160> 8

15 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

20 <211> 78

<212> DNA

<213> künstlich hergestellte Sequenz

<400> 1

25 gaaggaacta gtcatatggc tagctggagc caccgcagc tcgaaaaagg cgccagtaat 60

aatacatatc aacacgtt 78

30 <210> 2

<211> 54

<212> DNA

<213> künstlich hergestellte Sequenz

35 <400> 2

acgcgcaaag cttgtcgacg gatcctatca ttcttttacc ttaattatgt agtt 54

<210> 3

40 <211> 78

<212> DNA

<213> künstlich hergestellte Sequenz

<400> 3  
 gaaggaacta gtcatatggc ttgttggagc caccgcagc tcgaaaaagg cgccagtaat 60  
 aatacatatc aacacgtt 78  
 5

<210> 4  
 <211> 78  
 <212> DNA  
 10 <213> künstlich hergestellte Sequenz

<400> 4  
 gaaggaacta gtcatatggc tagctggagc caccgcagc tcgaaaaagg cgcttgaat 60  
 15 aatacatatc aacacgtt 78

<210> 5  
 <211> 19  
 20 <212> PRT  
 <213> künstlich hergestellte Sequenz

<400> 5  
 25 Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ser Asn Asn  
 1 5 10 15  
 Thr Tyr Gln

30  
 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> künstlich hergestellte Sequenz

35  
 <400> 6  
 Met Ala Cys Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ser Asn Asn  
 1 5 10 15  
 40 Thr Tyr Gln

<210> 7  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> künstlich hergestellte Sequenz

5

<400> 7

Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Cys Asn Asn  
 1 5 10 15

10

Thr Tyr Gln

<210> 8  
 <211> 539  
 <212> PRT  
 <213> künstlich hergestellte Sequenz

15

<400> 8

20 Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ser Asn Asn  
 1 5 10 15

Thr Tyr Gln His Val Ser Asn Glu Ser Arg Tyr Val Lys Phe Asp Pro  
 20 25 30

25

Thr Asp Thr Asn Phe Pro Pro Glu Ile Thr Asp Val Gln Ala Ala Ile  
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Pro Ala Gly Val Asn Gly Val Pro Asp Ala Ser Ser  
 30 50 55 60

Thr Thr Lys Gly Ile Leu Phe Leu Ala Thr Glu Gln Glu Val Ile Asp  
 65 70 75 80

35

Gly Thr Asn Asn Thr Lys Ala Val Thr Pro Ala Thr Leu Ala Thr Arg  
 85 90 95

Leu Ser Tyr Pro Asn Ala Thr Glu Ala Val Tyr Gly Leu Thr Arg Tyr  
 100 105 110

40

Ser Thr Asp Asp Glu Ala Ile Ala Gly Val Asn Asn Glu Ser Ser Ile  
 115 120 125

Thr Pro Ala Lys Phe Thr Val Ala Leu Asn Asn Val Phe Glu Thr Arg  
 130 135 140

Val Ser Thr Glu Ser Ser Asn Gly Val Ile Lys Ile Ser Ser Leu Pro  
 5 145 150 155 160

Gln Ala Leu Ala Gly Ala Asp Asp Thr Thr Ala Met Thr Pro Leu Lys  
 165 170 175

10 Thr Gln Gln Leu Ala Val Lys Leu Ile Ala Gln Ile Ala Pro Ser Lys  
 180 185 190

Asn Ala Ala Thr Glu Ser Glu Gln Gly Val Ile Gln Leu Ala Thr Val  
 195 200 205

15 Ala Gln Ala Arg Gln Gly Thr Leu Arg Glu Gly Tyr Ala Ile Ser Pro  
 210 215 220

Tyr Thr Phe Met Asn Ser Thr Ala Thr Glu Glu Tyr Lys Gly Val Ile  
 20 225 230 235 240

Lys Leu Gly Thr Gln Ser Glu Val Asn Ser Asn Asn Ala Ser Val Ala  
 245 250 255

25 Val Thr Gly Ala Thr Leu Asn Gly Arg Gly Ser Thr Thr Ser Met Arg  
 260 265 270

Gly Val Val Lys Leu Thr Thr Thr Ala Gly Ser Gln Ser Gly Gly Asp  
 275 280 285

30 Ala Ser Ser Ala Leu Ala Trp Asn Ala Asp Val Ile His Gln Arg Gly  
 290 295 300

Gly Gln Thr Ile Asn Gly Thr Leu Arg Ile Asn Asn Thr Leu Thr Ile  
 35 305 310 315 320

Ala Ser Gly Gly Ala Asn Ile Thr Gly Thr Val Asn Met Thr Gly Gly  
 325 330 335

40 Tyr Ile Gln Gly Lys Arg Val Val Thr Gln Asn Glu Ile Asp Arg Thr  
 340 345 350

Ile Pro Val Gly Ala Ile Met Met Trp Ala Ala Asp Ser Leu Pro Ser  
 355 360 365

5 Asp Ala Trp Arg Phe Cys His Gly Gly Thr Val Ser Ala Ser Asp Cys  
 370 375 380

Pro Leu Tyr Ala Ser Arg Ile Gly Thr Arg Tyr Gly Gly Ser Ser Ser  
 385 390 395 400

10 Asn Pro Gly Leu Pro Asp Met Arg Gly Leu Phe Val Arg Gly Ser Gly  
 405 410 415

Arg Gly Ser His Leu Thr Asn Pro Asn Val Asn Gly Asn Asp Gln Phe  
 420 425 430

15 Gly Lys Pro Arg Leu Gly Val Gly Cys Thr Gly Gly Tyr Val Gly Glu  
 435 440 445

Val Gln Lys Gln Gln Met Ser Tyr His Lys His Ala Gly Gly Phe Gly  
 20 450 455 460

Glu Tyr Asp Asp Ser Gly Ala Phe Gly Asn Thr Arg Arg Ser Asn Phe  
 465 470 475 480

25 Val Gly Thr Arg Lys Gly Leu Asp Trp Asp Asn Arg Ser Tyr Phe Thr  
 485 490 495

Asn Asp Gly Tyr Glu Ile Asp Pro Ala Ser Gln Arg Asn Ser Arg Tyr  
 500 505 510

30 Thr Leu Asn Arg Pro Glu Leu Ile Gly Asn Glu Thr Arg Pro Trp Asn  
 515 520 525

Ile Ser Leu Asn Tyr Ile Ile Lys Val Lys Glu  
 35 530 535



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
3. Januar 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/000888 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/10**,  
15/34, 15/62, C07K 14/01, 17/06, G01N 33/569, 33/543,  
35/00, C12Q 1/24, C07K 1/22

(74) Anwälte: **BETTENHAUSEN, Berthold** usw.; Dehmel &  
Bettenhausen, Müllerstr. 1, 80469 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02302

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
24. Juni 2002 (24.06.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 29 815.3 24. Juni 2001 (24.06.2001) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **PROFOS AG** [DE/DE]; Josef-Engert-Strasse 9,  
93053 Regensburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SCHÜTZ**,  
**Michael** [DE/DE]; Jakob-Schmid-Strasse 13, 93138  
Kareth-Lappersdorf (DE). **GRASSL, Renate** [DE/DE];  
Gumpelzhaimerstrasse 1, 93049 Regensburg (DE).  
**MEYER, Roman** [DE/DE]; Rosenstrasse 6, 92287  
Schmidmühlen (DE). **FRICK, Sibylle** [DE/DE]; Haupt-  
strasse 9, 93197 Zeitlarn (DE). **ROBL, Ingrid** [DE/DE];  
Käthe-Kollwitz-Strasse 32, 93055 Regensburg (DE).  
**ZANDER, Thomas** [DE/DE]; Goethestrasse 14a, 93138  
Lappersdorf (DE). **MILLER, Stefan** [DE/DE]; Holz-  
gartenstrasse 51, 93053 Regensburg (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 24. Dezember 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/000888 A3

(54) Title: METHOD FOR SEPARATING BACTERIAL CELLS AND CELL COMPONENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR AUFREINIGUNG VON BAKTERIENZELLEN UND ZELLBESTANDTEILEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for selectively separating bacterial cells and/or cell components, whereby the separation is carried out using a solid support.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur selektiven Aufreinigung von Bakterienzellen und/oder Zellbestandteilen, wobei die Aufreinigung mittels eines festen Trägers durchgeführt wird.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 02/02302

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/10 C12N15/34 C12N15/62 C07K14/01 C07K17/06  
 G01N33/569 G01N33/543 G01N35/00 C12Q1/24 C07K1/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUN W ET AL: "Use of bioluminescent Salmonella for assessing the efficiency of constructed phage-based biosorbent." JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY, vol. 25, no. 5, November 2000 (2000-11), pages 273-275, XP008016601 ISSN: 1367-5435 the whole document	1-17
X	WO 93 17129 A (JUDKINS PAUL W ;BIRCH RUTH E (US)) 2 September 1993 (1993-09-02) the whole document	1,3-5
	--- -/-- ---	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 April 2003

Date of mailing of the international search report

13/05/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Aslund, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 02/02302

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BENNETT A R ET AL: "THE USE OF BACTERIOPHAGE-BASED SYSTEMS FOR THE SEPARATION AND CONCENTRATION OF SALMONELLA" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, OXFORD, GB, vol. 83, no. 2, 1997, pages 259-265, XP001051057 ISSN: 1364-5072 the whole document</p>	1
X	<p>WO 01 09370 A (MILLER STEFAN ;PROFOS GMBH (DE)) 8 February 2001 (2001-02-08) the whole document</p>	1
X	<p>CAPARON MAIRE H ET AL: "Analysis of novel streptavidin-binding peptides, identified using a phage display library, shows that amino acids external to a perfectly conserved consensus sequence and to the presented peptides contribute to binding." MOLECULAR DIVERSITY, vol. 1, no. 4, 1996, pages 241-246, XP000884210 ISSN: 1381-1991 the whole document</p>	10
A	<p>WO 00 23792 A (SAUNDERS ANTHONY ;YISSUM RES DEV CO (IL); SHOSEYOV ODED (IL); FRIE) 27 April 2000 (2000-04-27) the whole document</p>	1-17
A	<p>HAUKANES B-I ET AL: "APPLICATION OF MAGNETIC BEADS IN BIOASSAYS" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 11, no. 1, 1993, pages 60-63, XP000609039 ISSN: 0733-222X</p>	
A	<p>SELIVANOV N A ET AL: "NUCLEOTIDE AND DEDUCED AMINO ACID SEQUENCE OF BACTERIOPHAGE T4 GENE12" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 16, no. 5, 1988, page 2334 XP001052994 ISSN: 0305-1048 the whole document</p>	12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 02/02302

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9317129	A	02-09-1993	AU 3776493 A WO 9317129 A1	13-09-1993 02-09-1993
WO 0109370	A	08-02-2001	AU 6686000 A CA 2380480 A1 WO 0109370 A2 DE 10036931 A1 EP 1198713 A2 JP 2003505105 T US 2002127547 A1	19-02-2001 08-02-2001 08-02-2001 23-05-2001 24-04-2002 12-02-2003 12-09-2002
WO 0023792	A	27-04-2000	AU 5670299 A CA 2347004 A1 EP 1123501 A1 WO 0023792 A1	08-05-2000 27-04-2000 16-08-2001 27-04-2000

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/02302

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7	C12N15/10	C12N15/34	C12N15/62	C07K14/01	C07K17/06
	G01N33/569	G01N33/543	G01N35/00	C12Q1/24	C07K1/22

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C07K C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SUN W ET AL: "Use of bioluminescent Salmonella for assessing the efficiency of constructed phage-based biosorbent." JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY, Bd. 25, Nr. 5, November 2000 (2000-11), Seiten 273-275, XP008016601 ISSN: 1367-5435 das ganze Dokument	1-17
X	WO 93 17129 A (JUDKINS PAUL W ;BIRCH RUTH E (US)) 2. September 1993 (1993-09-02) das ganze Dokument	1,3-5



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

29. April 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13/05/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Aslund, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>BENNETT A R ET AL: "THE USE OF BACTERIOPHAGE-BASED SYSTEMS FOR THE SEPARATION AND CONCENTRATION OF SALMONELLA"</p> <p>JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, OXFORD, GB, Bd. 83, Nr. 2, 1997, Seiten 259-265, XP001051057 ISSN: 1364-5072 das ganze Dokument</p>	1
X	<p>WO 01 09370 A (MILLER STEFAN ;PROFOS GMBH (DE)) 8. Februar 2001 (2001-02-08) das ganze Dokument</p>	1
X	<p>CAPARON MAIRE H ET AL: "Analysis of novel streptavidin-binding peptides, identified using a phage display library, shows that amino acids external to a perfectly conserved consensus sequence and to the presented peptides contribute to binding."</p> <p>MOLECULAR DIVERSITY, Bd. 1, Nr. 4, 1996, Seiten 241-246, XP000884210 ISSN: 1381-1991 das ganze Dokument</p>	10
A	<p>WO 00 23792 A (SAUNDERS ANTHONY ;YISSUM RES DEV CO (IL); SHOSEYOV ODED (IL); FRIE) 27. April 2000 (2000-04-27) das ganze Dokument</p>	1-17
A	<p>HAUKANES B-I ET AL: "APPLICATION OF MAGNETIC BEADS IN BIOASSAYS"</p> <p>BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, Bd. 11, Nr. 1, 1993, Seiten 60-63, XP000609039 ISSN: 0733-222X</p>	
A	<p>SELIVANOV N A ET AL: "NUCLEOTIDE AND DEDUCED AMINO ACID SEQUENCE OF BACTERIOPHAGE T4 GENE12"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 16, Nr. 5, 1988, Seite 2334 XP001052994 ISSN: 0305-1048 das ganze Dokument</p>	12

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/02302

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9317129	A	02-09-1993	AU	3776493 A	13-09-1993
			WO	9317129 A1	02-09-1993
WO 0109370	A	08-02-2001	AU	6686000 A	19-02-2001
			CA	2380480 A1	08-02-2001
			WO	0109370 A2	08-02-2001
			DE	10036931 A1	23-05-2001
			EP	1198713 A2	24-04-2002
			JP	2003505105 T	12-02-2003
			US	2002127547 A1	12-09-2002
WO 0023792	A	27-04-2000	AU	5670299 A	08-05-2000
			CA	2347004 A1	27-04-2000
			EP	1123501 A1	16-08-2001
			WO	0023792 A1	27-04-2000